

IONE MARIA RIBEIRO SOARES LOPES

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA DO
ENDOMÉTRIO DE MULHERES COM SÍNDROME DOS
OVÁRIOS POLICÍSTICOS DURANTE O TRATAMENTO
COM PROGESTERONA MICRONIZADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Doutor em
Ciências pelo Programa de Pós-Graduação
em Ginecologia

São Paulo

2013

IONE MARIA RIBEIRO SOARES LOPES

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA DO
ENDOMÉTRIO DE MULHERES COM SÍNDROME DOS
OVÁRIOS POLICÍSTICOS DURANTE O TRATAMENTO
COM PROGESTERONA MICRONIZADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do título de Doutor em Ciências pelo
Programa de Pós-Graduação em Ginecologia

Orientador:

Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

Co-orientadores:

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Maganhin

São Paulo

2013

Lopes, Ione Maria Ribeiro Soares.

Análise histomorfométrica e imunoistoquímica do endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos durante o tratamento com progesterona micronizada. Ione Maria Ribeiro Soares Lopes. - São Paulo, 2013. xxvii, 122 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ginecologia.

Título em Inglês: Histomorphometric and immunohistochemical analysis of the endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the treatment with micronized progesterone

1. Endométrio. 2. Implantação do embrião. 3. Moléculas de adesão celular. 4. Infertilidade feminina. 5. Anovulação. 6. Síndrome do ovário policístico.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA

Chefe do Departamento

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

Coordenador do Curso de Pós-graduação

Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

IONE MARIA RIBEIRO SOARES LOPES

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA DO
ENDOMÉTRIO DE MULHERES COM SÍNDROME DOS
OVÁRIOS POLICÍSTICOS DURANTE O TRATAMENTO
COM PROGESTERONA MICRONIZADA**

Presidente da banca:

Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Prof^a. Dr^a. Ângela Maggio da Fonseca

Prof. Dr. Alexandre Guilherme Zabeu Rossi

Prof^a. Dr^a. Carolina Sales Vieira Macedo

Suplentes:

Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel

Prof. Dr. José Gomes Batista

A Deus

por ter permitido este sonho transformar-se em realidade.

Ao Lauro,

meu marido, com amor, admiração e gratidão, pela compreensão,
colaboração técnica e seu incansável apoio e estímulo nos
momentos de insegurança dessa longa caminhada em busca do
conhecimento.

A meus filhos queridos

Lauro Rodolpho, Laiane e Larissa, fonte de amor e equilíbrio na
minha vida. Obrigada pelo carinho e compreensão nos momentos
da minha ausência nos almoços familiares e aniversários.

A minha mãe Noemi (*in memoriam*)

Uma mulher com mentalidade sempre à frente do seu tempo, de
quem cultivo os ensinamentos que permitiram ser o que sou hoje.

Aos demais membros da minha família que sempre me apoiaram e
estimularam nos meus sonhos de evoluir.

.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Maria Soares Júnior**

Pelo exemplo de homem de princípios sólidos, pesquisador incansável, irrequieto na constante busca das respostas do conhecimento científico e por sintetizar o verdadeiro sentido da liderança. Principal incentivador e responsável por todo esse projeto. Os meus sinceros agradecimentos por ter acreditado no meu potencial e sempre proferindo palavras de estímulo a minha menor claudicação nessa caminhada do “saber”. Agradeço a sua imensurável contribuição.

Aos meus co-orientadores:

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat,

Pela gentil recepção e por ter acreditado no meu compromisso, mesmo sem me conhecer. O senhor sempre foi meu ídolo profissional desde o início da minha carreira de docente, com sua postura ética e competente em tudo que faz. Meus eternos agradecimentos, admiração e respeito.

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Pelo apoio técnico, científico e humano nas diversas etapas desta jornada. O senhor, admirável e honrado professor, foi minha âncora desde os primeiros passos desse projeto, sempre com a sapiência e a paciência que lhe é peculiar. Manifesto, também, meus eternos agradecimentos, admiração e respeito.

A Prof.^a Dr.^a Carla Cristina Maganhin

Colega e companheira desde o início do doutorado, obrigada pela amizade e apoio técnico, por ter sido acima de tudo uma irmã de maior experiência a me ajudar e aconselhar em todos os momentos que precisei para a concretização deste trabalho.

À **Prof.^a Dr.^a Valéria Petri**

Pela ajuda prestimosa no passo inicial da realização desse projeto de vida profissional. Obrigada por sua contribuição de forma marcante nesse processo.

Ao Magnífico Reitor da UFPI, **Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes** e ao Ex-Reitor **Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior**, pelo apoio financeiro em algumas etapas do estudo.

Às **pacientes** que cederam um pedacinho do seu corpo em prol do conhecimento científico e permitiram que as informações, exames e dados de seus prontuários se transformassem nos resultados deste trabalho.

À minha equipe de secretárias: **Emidia, Efigênia, Lúcia, Socorro, Samantha, Yalane, Carmem, Lara, Arlandes e Swami**; pela cooperação em todos os momentos deste projeto.

À **direção do Hospital Getúlio Vargas**, instituição onde foi realizada a seleção das pacientes.

À Prof.^a **Dr.^a Semíramis** do laboratório LIB pela ajuda na conservação do material de Biologia Molecular.

Ao **Departamento de Endocrinologia Ginecológica da UNIFESP** pelo aceite da realização desse estudo.

Aos colegas e funcionários da Histologia da UNIFESP, especialmente o **Paulinho, a Adriana, o Luiz Fernando e a Roberta**, pelo companheirismo, ajuda técnica e sugestões pertinentes.

À **Gisela e Rinaldo** pela contribuição técnica e emocional no final desse trabalho.

À Prof.^a **Dr.^a Regina** por suas observações, sempre pertinentes e construtivas.

À secretária da pós-graduação, **Karim**, pelo grande profissionalismo, ajuda prestimosa e colaboração em todos os momentos que se fizeram necessário.

À secretária do Departamento de Ginecologia, **Zélia**, pela disponibilidade e simpatia na condução dos problemas administrativos.

À secretária da Disciplina de Endocrinologia Ginecológica, **Valéria**, pela atenção e disponibilidade de informações solicitadas.

Ao Prof **Dr. Fernando Ferreira** pelas informações técnicas pertinentes.

Às funcionárias da LABOPAC e LAPAC: **Helenice e Ana Raquel**, pela colaboração inestimável na separação das lâminas e blocos de parafina.

À ilustre patologista Prof.^a **Teresinha Castelo Branco** pela presteza e disposição na confecção e análise histológica em HE das lâminas do estudo.

Ao Prof. Dr. **José Gerônimo Júnior** pela gentileza e presteza na confecção e análise histológica em HE das lâminas do estudo.

Ao amigo **Edson Ferreira Filho** pelo suporte técnico e apoio psicológico nessa trajetória do conhecimento.

Ao **Ruan**, funcionário da Renorbio (Rede Nordeste de Biotecnologia) pela cooperação para realização de alguns cursos obrigatórios do doutorado.

Enfim, agradeço a **todos** que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

.

Objetivo: Avaliar a histomorfometria e a expressão das moléculas de adesão no endométrio de mulheres com ciclos menstruais normais e com síndrome dos ovários policísticos (SOP) tratadas com progesterona micronizada. **Casuística e Método:** Estudo prospectivo, caso-controle, incluindo 80 mulheres, sendo 40 com inférteis com SOP e 40 com ciclos menstruais regulares e com pelo menos um filho (controle). No grupo controle foram realizadas duas biópsias endometriais, uma na fase proliferativa (9º dia) e outra na secretora (23º dia). Já no grupo SOP a primeira biópsia foi realizada sem tratamento e a segunda 10 dias após a administração de progesterona micronizada (200mg/dia, por via oral). Assim, biópsias endometriais foram fixadas em formol a 10% e processadas para inclusão em parafina. Alguns cortes de 5 µm foram corados pela hematoxilina e eosina, para avaliação histomorfométrica e outros submetidos a análise imunoistoquímica para identificação das moléculas de adesão ($\alpha\beta3$ -integrina, do ligante MECA-79 da L-selectina, E-caderina e ICAM-1) no endométrio dos dois grupos. Os dados obtidos foram submetidos ao teste *t* de *Student* não pareado ou de Mann-Whitney ($p<0,05$)

Resultados: O endométrio de mulheres com SOP durante o uso da progesterona apresentou maior espessura do epitélio luminal e menor número de glândulas do que as mulheres do grupo controle durante a fase secretora ($p<0,01$). Além disso, o grupo SOP apresentou diminuição da imunoexpressão da $\alpha\beta3$ -Integrina e do MECA-79 em relação ao grupo controle na fase secretora ($p<0,01$), enquanto a E-caderina foi maior em mulheres com SOP durante o tratamento com progesterona ($p<0,05$). Já a ICAM-1 foi menor que o controle na fase proliferativa ($p<0,05$).

CONCLUSÃO: A progesterona na dose utilizada não foi suficiente para reverter totalmente as modificações histomorfológicas e dos marcadores de receptividade no endométrio de mulheres com SOP.

Palavras-chaves: Anovulação, Moléculas de adesão celular, infertilidade feminina, endométrio, implantação do embrião, Síndrome do ovário policístico.

OBJECTIVE: To evaluate the histomorphometry and expression of adhesion molecules in the endometrium with women normal menstrual cycles and women polycystic ovary syndrome (PCOS) treated with micronized progesterone.

METHOD: Prospective, case-controlled study including 80 women, 40 of whom were infertile due to PCOS and 40 of whom were fertile (control). These underwent two endometrial biopsies, one in the proliferative phase (9th day) and the other in the secretory phase (23rd day). The women with PCOS underwent their first biopsy before receiving treatment and their second intervention after 10 days of micronized progesterone administration (200mg/day, via oral route). The endometrial biopsies were fixed in 10% formaldehyde and processed for paraffin embedment. A few 5- μ m sections were stained with hematoxylin and eosin for histomorphometric evaluation, and others underwent immunohistochemical assessment for identification of adhesion molecules (α v β 3 integrin, MECA-79 (L-selectin), E-cadherin, and ICAM-1) in the endometrium of both groups. The data thus obtained were analyzed using the unpaired Student *t* test or the Mann-Whitney test ($p < 0.05$).

RESULTS: The endometrium of the women with PCOS during progesterone administration had thicker luminal epithelium and a smaller number of glands than the control women in the secretory phase ($p < 0.001$). The PCOS women also had decreased immunoexpression of α v β 3 integrin and MECA-79 as against the control group in the secretory phase ($p < 0.001$), whereas their E-cadherin expression was more abundant during the progesterone treatment ($P < 0.05$), and ICAM-1 expression was more inhibited than that of the controls in the proliferative phase ($p < 0.05$).

CONCLUSION: Progesterone in the administered dose was unable to achieve total reversion of the changes in endometrial histomorphology and receptivity markers in the women with PCOS.

Key words: Anovulation, cell adhesion molecules, female infertility, endometrium, embryo implantation, polycystic ovary syndrome

Dedicatória.	v
Agradecimentos especiais	vii
Agradecimentos	x
Resumo	xiii
Abstract	xvi
Sumário	xix
Lista de Figuras	xxii
Lista de Figuras do Artigo	xxiv
Lista de Tabelas do Artigo	xxvi
Lista de Abreviaturas e Siglas	xxviii
1. Introdução.....	1
1.1 Morfologia do endométrio normal.....	5
1.2 Janela de implantação.....	.9
1.3 Endométrio na “janela de Implantação” na síndrome dos ovários policísticos.....	18
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. Casuística e Métodos	24
3.1 Casuística	25
3.2 Métodos	29
4. Resultados.....	33
4.1 Artigo enviado para publicação	34
5. Discussão	70
6. Conclusões	81
7. Referências Bibliográficas	84
8. Anexos	103
Anexo I Parecer do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo	104

Anexo II	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	106
Anexo III	Ficha de coleta de dados.....	110
Anexo IV	Artigo publicado na Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB).....	115

Fig. 1	Esquema ilustra as etapas da implantação do embrião	11
Fig. 2	Esquema representa a dupla ação da E-caderina	15
Fig. 3	Fluxograma do Estudo	27

Fig. 1 Representação gráfica do índice total e fotomicrografias de amostras de endométrio após imunoistoquímica da expressão da α -v β 3-Integrina, E-caderina, ligante da L-selectina (MECA-79) e ICAM-1 dos grupos controle e SOP da fase proliferativa. Esquema ilustrando as etapas da implantação do embrião

66

Fig. 2 Representação gráfica do índice total e fotomicrografias de amostras de endométrio após imunoistoquímica da expressão da α -v β 3-Integrina, E-caderina, ligante da L-selectina (MECA-79) e ICAM-1 dos grupos controle e SOP da fase secretora. Esquema ilustrando as etapas da implantação do embrião

67

Tabela 1	Características clínicas e ultrassonográficas das mulheres do grupo controle e do grupo SOP incluídas no estudo (média e desvio-padrão... ..	68
Tabela 2	Média e erro-padrão dos achados histomorfométricos e da imunoexpressão da α -v β 3-Integrina, E-caderina, ligante da L-selectina (MECA-79) e ICAM-1 no epitélio luminal do endométrio de mulheres do grupo controle e de mulheres com SOP antes e durante o uso da progesterona.....	69

Abreviaturas	Descrição
AEPCOS	Androgen Excess and PCOS Society
ASRM	American Society of Reproductive Medicine
AR	Receptor de Androgênio (Androgen Receptor)
CA	Cintura abdominal
CAMs	Moléculas de adesão celular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
17-α-OH-P	17- alfa-Hidróxi-Progesterona
DHEA-S	Sulfato de Desidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESHRE	European Society for Human Reproduction and Embriology
FIV	Fertilização in vitro
FSH	Hormônio estimulante folicular
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H.E	Hematoxilina e eosina
HGV	Hospital Getúlio Vargas
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulín
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IGFBP-1	Proteína ligante de IGF-1
IMC	Índice de Massa Corporal
LH	Hormônio luteinizante
NIH	National Institute of Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
RI	Resistencia Insulínica
RNA	Ácido ribonucleico
SHBG	Globulina carreadora de hormônios sexuais

SOP	Síndrome dos ovários policísticos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TiF2	Fator 2 intermediário transcricional
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
TSH	Hormônio tireoestimulante
T4	Tiroxina (levotironina)
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
WHO	World Organization of Health

A Síndrome dos ovários policísticos (SOP), que foi inicialmente descrita por STEIN e LEVENTHAL em 1935, é caracterizada pela associação entre ovários policísticos, amenorreia, infertilidade, hirsutismo e obesidade (SPEROFF e FRITZ, 2011). Estima-se afetar em torno de 5 a 10% da população feminina em idade reprodutiva, representando a causa mais frequente de infertilidade anovulatória (QIAO et al., 2008; CAKMAK e TAYLOR., 2011; AZZIZ et al., 2006; WITCHEL et al., 2012).

A diversidade das características clínicas da SOP levou a realização de três consensos para estabelecer critérios diagnósticos dessa síndrome. O primeiro foi a reunião do *National Institute of Health* (1990) que definiu como critérios diagnósticos a presença de hiperandrogenismo clínico ou laboratorial, e de ciclos espaniomenorreicos ou amenorréia (menos que seis ciclos por ano), desde que afastadas outras alterações, tais como a síndrome de Cushing, hiperprolactinemia, deficiência enzimática da suprarrenal, neoplasias secretoras de androgênios e distúrbios da tireóide (BARACAT et al., 2007). O segundo consenso foi o de ROTTERDAM (2003), realizado pelas *European Society for Human Reproduction and Embriology* (ESHRE) e a *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM), que estabeleceram como critérios diagnósticos: ciclos espaniomenorreicos ou amenorréia (anovulação crônica), sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo e a presença de ovários policísticos (identificados pela ultrassonografia), sendo necessários pelo menos dois desses três critérios para se definir o diagnóstico da SOP (TRIVAX e AZZIZ, 2007). O terceiro consenso foi proposto pela *Androgen Excess and PCOS Society* (AE-PCOS) em 2006, requerendo como requisitos diagnósticos: hiperandrogenismo (hirsutismo e/ou

hiperandrogenemia) e disfunção ovariana (oligo/anovulação e/ou ovários policísticos), excluindo outras causas de excesso de androgênios (AZZIZ et al., 2009; GUASTELLA et al., 2010). Assim, baseados nos critérios ESHRE/ASRM (2003) e da AE-PCOS Society (AZZIZ et al., 2009; DIAMANTI-KANDARAKIS e DUNAIF, 2012), podem ser identificados o grande espectro de sinais e sintomas que se encontram nessas pacientes (MOTTA, 2010).

A fisiopatologia da SOP tem intrigado ginecologistas e endocrinologistas por muitos anos e mostra muita dificuldade em ser definida. As características clínicas da SOP refletem um desarranjo do desenvolvimento folicular que resulta em anovulação crônica, onde o meio endócrino é caracterizado por um estado de equilíbrio no qual as concentrações das gonadotrofinas e dos esteróides sexuais têm pouca variação em comparação com o padrão cíclico das concentrações hormonais que ocorrem durante os ciclos normais (GIUDICE, 2006). A SOP exhibe aumento das concentrações séricas de LH (hormônio luteinizante) em torno de 60% dos casos, níveis baixos de FSH (hormônio folículo estimulante) e aumento da relação LH/FSH. A diminuição dos níveis de FSH resulta do aumento da frequência dos pulsos do GnRH (hormônio liberador das gonadotrofinas), da elevação crônica da estrona (aromatização periférica da androstenediona) e dos níveis normais ou discretamente aumentados da Inibina B, derivada dos pequenos folículos ovarianos (LAVEN et al., 2001).

A SOP tem sido considerada como uma desordem complexa, com interação de variantes genéticas e fatores ambientais, que podem interagir combinar e contribuir para a fisiopatologia (AZZIZ et al., 2009). Estudos têm sido desenvolvidos

para identificar variantes genéticas envolvendo a regulação da secreção e ação das gonadotrofinas, da insulina, da regulação energética e peso além da síntese e ação dos andrógenos (SPEROFF e FRITZ, 2011).

Uma associação entre intolerância à glicose e hiperandrogenismo foi reconhecida inicialmente por ARCHARD e THIERS em 1921, quando descreveram o caso de uma mulher diabética com barba (SPEROFF e FRITZ, 2011). A resistência à insulina, com hiperinsulinemia compensatória, é atualmente reconhecida como um dos fatores-chave nessa síndrome (MUSSO et al., 2004; KATSIKIS et al., 2011; BATISTA et al., 2012). Cerca de 35% das mulheres com SOP cursam com intolerância à glicose e 7 a 10% preenchem os critérios de diabetes tipo 2. A ação da insulina em excesso seria exercida por uma ação direta nas células tecaais ovarianas, via receptor de IGF-1 ou da própria insulina, ou ainda pela redução da produção hepática da proteína ligante da IGF (IGFBP), aumentando a biodisponibilidade de IGF-1 e IGF-2, além de estimular o citocromo P450c17 α que aumenta a produção androgênica ovariana e adrenal (MARCONDES et al., 2007). A insulina e LH atuam sinergicamente estimulando a produção androgênica ovariana. A obesidade é uma característica comum na SOP, representando outro mecanismo para o desenvolvimento da resistência a insulina (IUORNO et al., 2002; CHEANG et al., 2008).

A resistência à insulina e hiperinsulinemia são importantes na fisiopatologia da SOP, mas cerca de 25 a 50% dessas mulheres não têm essas alterações, levando a considerar que a resistência à insulina e hiperinsulinemia não são causas primárias ou fator patogênico de todas as mulheres com SOP (SPEROFF e FRITZ, 2011).

A disfunção ovariana (anovulação ou a baixa produção de progesterona) das mulheres com SOP pode aumentar o risco para abortamento (SAVARIS et al., 2011). Enquanto a anovulação é uma causa óbvia de infertilidade na SOP, dados emergentes sugerem que a receptividade endometrial também contribui para a infertilidade (DONAGHAY e LESSEY, 2007; SALAMONSEN et al., 2009; CAKMAK e TAYLOR, 2011).

A ocorrência de ovulação espontânea em mulheres espaniomenorréicas com SOP não necessariamente leva a um aumento na receptividade endometrial, principalmente em programas de fertilização (QUEZADA et al., 2011). Por outro lado, o tratamento da infertilidade com agentes indutores da ovulação, como o citrato de clomifeno, tem resultados desapontadores, com baixa taxa de gravidez (SAVARIS et al., 2011). Este fato é talvez melhor ilustrado na fertilização *in vitro* (FIV), quando também as taxas de sucesso encontradas continuam baixas, apesar da excelente qualidade dos embriões transferidos. Isso sugere que a anovulação não é a única causa da infertilidade (DONAGHAY e LESSEY, 2007), levando a crer que a receptividade endometrial poderia ter um papel crucial no estabelecimento e desenvolvimento da gravidez em mulheres com SOP.

1.1 Morfologia do endométrio normal

O endométrio é a mucosa que reveste a cavidade do útero, com uma origem embriológica da linha de fusão dos ductos mullerianos, por volta da 20ª semana de gestação. A superfície é recoberta por epitélio cilíndrico simples em contato, profundamente, com um sistema glandular e estroma endometrial. Tem um papel

essencial na reprodução e é considerado um dos mais complexos tecidos do corpo humano, respondendo a mudanças cíclicas do estrogênio e progesterona do ciclo menstrual ovariano, como também a interação complexa entre fatores autócrinos e parácrinos (SPEROFF e FRITZ, 2011).

A descrição da fisiologia menstrual é desenvolvida baseada nas mudanças anatômicas e funcionais específicas nas glândulas, nos vasos sanguíneos e no estroma do endométrio. Essa distribuição ocorre de uma forma simplificada nas fases: proliferativa (inicial, média e tardia) e fase lútea ou secretora (inicial, média e tardia) (GIORDANO et al., 2009). O processo inteiro constitui um ciclo evolutivo integrado de crescimento e regressão endometriais, que se repetem durante toda a vida reprodutiva feminina (MURRAY et al., 2004; JABBOUR et al., 2006).

A fase proliferativa é associada com o crescimento folicular e o aumento da secreção de estrogênio, levando a reconstrução endometrial. Mitoses tornam-se proeminentes e a pseudoestratificação é observada. Todos os componentes tissulares (glândulas, células estromais e endoteliais) demonstram proliferação, com síntese nuclear de DNA e citoplasmática de RNA, com pico nos dias 8-10 do ciclo, refletindo máxima concentração de receptores estrogênicos no endométrio (BERGERON et al., 1988). Característica importante dessa fase é o aumento de células ciliadas e de células com microvilos, necessárias para a mobilização e distribuição das secreções endometriais. Os microvilos são extensões citoplasmáticas das células do epitélio endometrial, em resposta ao estradiol e tem por função aumentar a superfície ativa das células (RASHID et al., 2011).

O primeiro sinal morfológico de que ocorreu a ovulação é o aparecimento de vacúolos de glicogênio intracitoplasmáticos no epitélio glandular, por volta do 18º dia

do ciclo menstrual. As células glandulares ficam tortuosas e exibem no seu interior um sistema de canais nucleolares devido à progesterona. Os vasos ficam mais espiralados, surge uma secreção ativa de glicoproteínas e peptídeos na cavidade endometrial. Transudações do plasma e imunoglobulinas da circulação são também enviadas para a região, por proteínas ligantes produzidas pelas células epiteliais. O pico secretório é atingido sete dias após o pico de gonadotrofinas do meio do ciclo, coincidindo com o tempo de implantação do blastocisto. A proliferação cessa três dias após a ovulação, com declínio nas mitoses e síntese de DNA devido à interferência da progesterona com a expressão do receptor estrogênico (TABIBZADEH e BABAKNIA, 1995).

A fase secretora apresenta sinais da reação combinada da atividade do estrogênio e progesterona no endométrio. A progesterona estimula a 17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase e sulfotransferase, que converte o estradiol para sulfato de estrona, e este é rapidamente excretada da célula (SPEROFF e FRITZ, 2011). A progesterona pode inibir genes específicos que passam por variações cíclicas durante o ciclo menstrual e também antagoniza a ação estimulatória de muitos oncogenes que provavelmente mediam o crescimento induzido pelo estrogênio. O resultado final é uma estabilidade da mucosa endometrial e, conseqüentemente, a prevenção dos estados hiperplásicos (LESSEY, 2003; SPEROFF e FRITZ, 2011).

A fase lútea é amplamente estudada e as modificações histológicas revestem-se de importância clínica, servindo como orientação para o diagnóstico de ovulações imperfeitas, impróprias para o processo de nidação. A fase lútea inicial (15º dia) caracteriza-se pela presença de vacúolos secretores ricos em glicogênio abaixo do

núcleo. Na fase secretora média, os vacúolos situam-se próximo à luz das glândulas, os núcleos localizam-se na posição basal e há secreção na luz glandular além de edema do estroma. A espessura endometrial atinge 6-8 mm. Na fase lútea tardia ocorrem modificações do estroma, onde as arteríolas proeminentes e dilatadas atingem até a camada superficial, e o endométrio é então chamado de pré-decídua. A ausência de gravidez determina a involução do corpo lúteo, com a consequente queda dos níveis de estrogênio e progesterona, e a ocorrência da menstruação (SPEROFF e FRITZ, 2011).

Os níveis adequados desses hormônios são importantes para o desenvolvimento endometrial harmônico, glandular e estromal, possibilitando a receptividade para a implantação do blastocisto. Na ausência do adequado preparo endometrial, haverá inúmeras possibilidades de infertilidade (ACHACHE e REVEL, 2006).

NOYES et al. (1975) examinaram as características histológicas de biópsias endometriais realizadas durante 8.000 ciclos espontâneos em 300 mulheres. A partir daí instituíram os critérios de datação endometrial que foram aceitos como padrão ouro para a receptividade do endométrio, permitindo a detecção de anormalidades no mesmo. Esse trabalho clássico é ainda hoje muito utilizado para a análise cronológica das mudanças endometriais, contudo têm sido identificadas deficiências. A datação é mais específica na fase lútea inicial e tardia, mas não no período da janela de implantação, com demonstração de poucos parâmetros histológicos e grande variabilidade entre os observadores, principalmente nas mulheres inférteis nessa fase do ciclo (MYERS et al., 2004).

Estudos recentes da expressão gênica no tecido endometrial mostraram que alguns genes presentes na fase proliferativa do ciclo menstrual são essencialmente relacionados à replicação do DNA, levando a proliferação e remodelação das células. Após a ovulação, com a produção da progesterona, o endométrio sofre uma série de alterações, incluindo a inibição da proliferação celular, da síntese do DNA e da atividade mitótica, iniciando a diferenciação celular, que está relacionada com a preparação do endométrio para possível implantação embrionária. A inibição da proliferação do tecido epitelial está relacionada a genes regulados pela progesterona, incluindo a *down-regulation* dos receptores de estrogênio e a *up-regulation* de enzimas metabolizadoras do estrogênio do tipo 17- β - hidroxisteróide desidrogenase, o que efetivamente minimiza a ação estrogênica nesse tipo de célula. Além disso, a progesterona está relacionada com a regulação do receptor de andrógeno (AR) no epitélio e no estroma sete a dez dias após a ovulação, onde o endométrio torna-se receptivo à implantação embrionária no período denominado de "janela de implantação" (GIUDICE, 2006).

1.2 Janela de implantação

A implantação embrionária representa o passo mais crítico do processo reprodutivo em muitas espécies. Consiste em um fenômeno biológico, no qual o blastocisto liga-se intimamente à superfície endometrial para formar a placenta a qual fornece uma interface entre o feto e a circulação materna (APLIN, 2000; GUZELOGLU-KAYISLI et al., 2009). A implantação requer endométrio receptivo,

embrião no estágio de blastocisto e uma interação entre ambos (SIMON et al., 2000). Os dados existentes na literatura ainda são poucos sobre o endométrio e os mecanismos iniciais da nidificação (DONAGHAY e LESSEY, 2007).

O processo da implantação ocorre de forma sequencial, onde cada passo acontece para assegurar o próximo, levando ao estabelecimento da gravidez. É classificado em três estágios: aposição, adesão e invasão. Na fase de aposição o embrião polarizado deixa a zona pelúcida e se sobrepõe ao endométrio, e as células do trofoblasto se fixam de uma forma instável à superfície do epitélio endometrial receptivo em humanos (ENDERS, 1967; TABIBZADEH e BABAKNIA, 1995; STAUN-RAN e SHALEV, 2005; SALAMONSEN, 2009; MARGARIT et al., 2010). O blastocisto, em seguida, se adere de forma íntima ao epitélio endometrial, na lâmina basal e na matriz extracelular estromal. Neste ponto, a ligação entre o endométrio e o embrião é suficientemente íntima para resistir ao deslocamento pelo fluxo uterino, ou seja, as L-selectinas presentes nas mucinas (glicoproteína 1 - MUC1) das células do epitélio superficial do endométrio expressam epítomos receptivos que auxiliam a fixação do blastocisto (MARGARIT et al., 2010). O primeiro sinal dessa reação ocorre ao redor do 21º do ciclo menstrual em humanos e coincide com um aumento da permeabilidade vascular, no local da fixação do blastocisto. Em seguida ocorre a penetração do blastocisto, invadindo o estroma para estabelecer uma relação com a vascularização materna e, embora essa atividade seja principalmente controlada pelo trofoblasto, a decídua também limita a extensão da invasão (Figura 1) (SHARKEY e SMITH, 2003; ÇAKMAK e TAYLOR, 2011; SALAMONSEN, 2009).

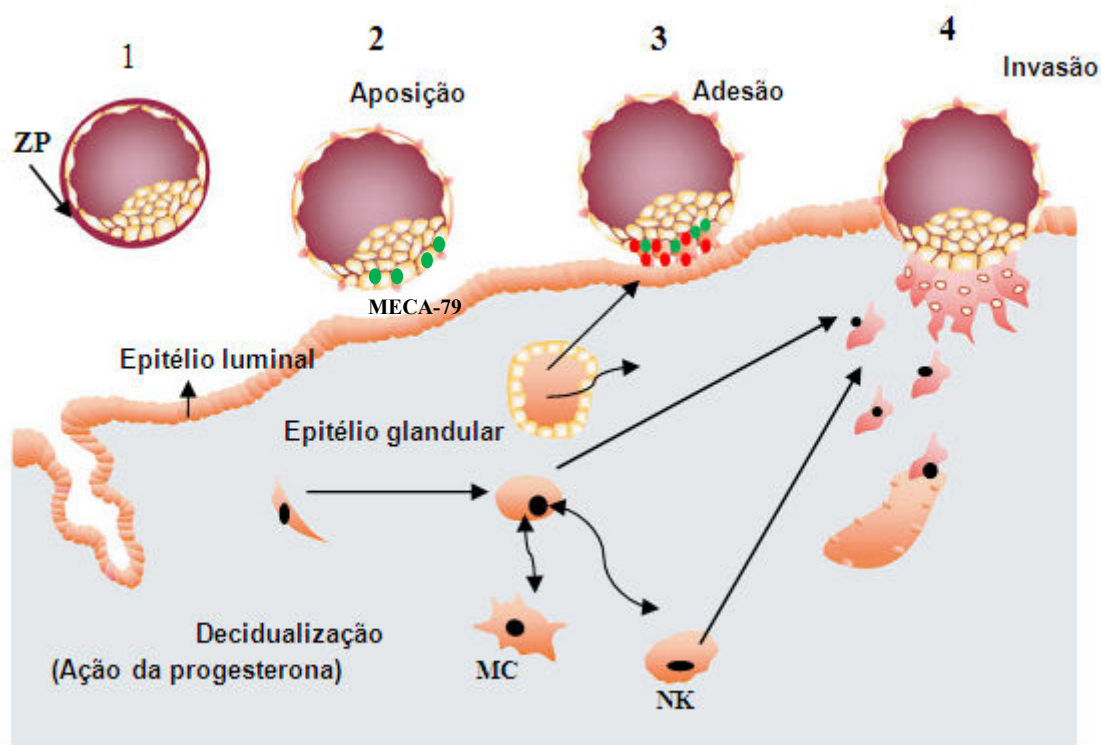


Figura 1: Esquema ilustra as etapas da implantação do embrião 1- Blastocisto livre na cavidade uterina, **ZP**-zona pelúcida; 2- Aposição gradual do blastocisto ao endométrio (integrinas em vermelho, selectinas em verde); 3- Adesão (as integrinas do trofoblasto, em vermelho, são necessárias nesta etapa; a adesão induz reações nas células trofoblásticas que se diferenciam em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto); 4- Invasão (Íntimo contato do trofoblasto com o estroma decidualizado) MC- macrófagos, NK- *natural killer*. (Adaptado de Salamonsen, 2009).

A implantação ocorre durante um período limitado entre o 20º e 24º dia do ciclo menstrual que é denominado “janela de implantação” (PSYCHOYOS, 1973). Este processo envolve uma sequência complexa de eventos que é crucial para estabelecer a gravidez. Um grande número de mediadores moleculares, sob a influência dos hormônios ovarianos, tem sido postulado estar envolvido nesta interação feto-materna (ACHACHE e REVEL, 2006). Alterações morfofuncionais durante esse período podem impedir ou dificultar a implantação. Por esse motivo, o estudo do endométrio nessa fase é importante para o aprimoramento dos

mecanismos envolvidos na interação materno-embrionária (CAKMAK e TAYLOR, 2011).

Durante a janela de implantação as células do estroma endometrial passam por um processo de decidualização por ação da progesterona, um processo que se caracteriza por alterações no citoesqueleto (*down-regulation* da actina do músculo liso) e *up-regulation* da prolactina, dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), de proteínas de ligação IGF (IGFBPs), dos receptores de insulina, da relaxina, entre outros. O processo de decidualização é importante para regular a invasão do trofoblasto e estabelecer um ambiente adequado de citocinas e imunomoduladores no estroma durante a implantação. Na ausência da implantação do embrião, inicia-se a retirada de estrogênio e progesterona, uma mudança nos imunomoduladores juntamente com apoptose celular e aumento da produção de metaloproteínases e prostaglandinas, resultando na descamação do tecido endometrial e menstruação (CAKMAK e TAYLOR, 2011; BELLVER et al., 2011).

Um grande número de moléculas já foi identificado sobre a superfície endometrial ou do embrião, mas a precisa função de cada uma permanece desconhecida. Investigadores têm explorado várias proteínas sinalizadoras, tais como as interleucinas, receptores e ligantes, citocinas e fatores de crescimento, para determinar como o embrião se implanta no endométrio. Um melhor entendimento da participação molecular na implantação possibilitará o conhecimento das falhas da nidificação do blastocisto no endométrio (ACHACHE e REVEL, 2006; DONAGHAY e LESSEY, 2007).

A receptividade do endométrio consiste na aquisição de ligantes de adesão associados com menos componentes inibitórios, que poderiam formar uma barreira à implantação (APLIN, 2000).

A família de moléculas de adesão celular é composta de quatro membros: as integrinas, as caderinas, as selectinas e imunoglobulinas. A superfície ligante, usualmente glicoproteínas, intermedia a adesão célula-a-célula e tem como função clássica a manutenção da integração tecidual, cicatrização de ferida, migração celular e metástase de tumores (ACHACHE e REVEL, 2006). Um modelo mostrado na literatura é o de uma possível expressão da L-seletina na superfície do embrião e o endométrio expressa ligantes apropriados e integrinas. Este mecanismo mimetiza a migração de outras células, incluindo os leucócitos, para locais do endotélio inflamado (DONAGHAY e LESSEY, 2007).

As integrinas, moléculas de adesão celular (CAMs), são consideradas como boas marcadoras da receptividade endometrial e vitais para a comunicação celular (LESSEY et al., 1992; TABIBZADEH e BABAKNIA, 1995). Constituem uma família de glicoproteínas de membrana que ligam proteínas de adesão da matriz extracelular aos componentes do citoesqueleto, formadas pela associação de duas diferentes ligações não-covalentes: subunidade α e β (HEMLER, 1990; HYNER, 1992; ZHAO et al., 2010).

As integrinas participam na matriz celular e adesão célula a célula em muitos processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento embriológico, hemostasia, trombose, cicatrização de feridas, mecanismos de defesas imunes e não imunes e transformação oncogênica. Uma grande variedade de integrinas tem sido mostrada dentro da luz do epitélio endometrial glandular (ZHAO et al., 2010). Foi descrito um

aumento no endométrio das integrinas $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha V \beta 3$ na fase lútea média (20º-24º dia do ciclo menstrual), sendo que a expressão da subunidade $\beta 3$ não mostrou aumento antes do 19º dia. Foi proposto que esta subunidade seja um receptor endometrial do blastocisto (LESSEY, 2003). Sofrem influências hormonais, onde altos níveis estrogênicos inibem a expressão das integrinas e os níveis de progesterona a aumenta. Tem sido mostrado que as integrinas são expressas pelo trofoblasto na época da implantação (WANG e ARMANT, 2002), mostrando a possibilidade de um modelo “sanduíche” na adesão embrionária (ACHACHE e REVEL, 2006).

As caderinas constituem um grupo de glicoproteínas transmembrana de superfície celular responsáveis pelo mecanismo de adesão célula a célula cálcio-dependente. Elas são divididas nas sub-classes E, P e N-caderinas. Em relação à implantação, a subunidade E-caderina é a mais estudada e localizada na membrana celular plasmática lateral, importante para a junção entre as células epiteliais (SINGH e APLIN, 2009).

Estudos em embriões de ratas têm mostrado que mutações genéticas da E-caderina resulta em defeito na pré-implantação (RIETHMACHER et al., 1995). O papel desta proteína na implantação humana não é conhecido, contudo seus níveis tem se mostrado aumentado na fase lútea (FUGIMOTO et al., 1996), embora não tenha sido evidenciado variações no ciclo menstrual por estudos imunoistoquímicos (PONCELET et al., 2002). Estudos *in vitro* com cultura de células Ishikawa mostraram um aumento transitório do cálcio intracelular desencadeado pela calcitonina, suprimindo a expressão da E-caderina no local do contato celular (LI et al., 2002). A progesterona induz a expressão da calcitonina no epitélio endometrial

na fase secretora média do ciclo menstrual (KUMAR et al., 1998), provavelmente regulando a expressão da E-caderina. É possível que a E-caderina tenha uma dupla função: na fase inicial é necessária para a adesão celular e na época da implantação, diminui para possibilitar a invasão do blastocisto (Figura 2- A e B) (ACHACHE e REVEL, 2006).

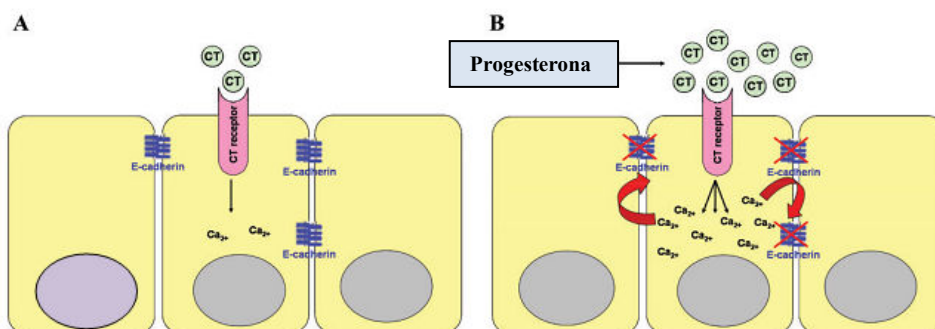


Figura 2- Esquema representa a dupla ação da E-caderina. A- Células epiteliais aderidas na parede lateral da membrana plasmática pela ação da E-caderina controlada pelo cálcio intracelular; B- A progesterona induz a expressão da calcitonina aumentando o cálcio intracelular, o qual diminui a expressão da E-caderina. CT-calcitonina (Adaptada de Achache e Revel, 2006).

As selectinas são glicoproteínas que também pertencem a família CAM e incluem a P-selectinas, L-selectina e E-selectina. A L-selectina é importante no processo de implantação humana e consiste de um grande domínio extracelular glicosilado e uma pequena cauda citoplasmática (SMALLEY e LEY, 2005). São conhecidas por ter um papel no trânsito transendotelial de leucócitos (ALON e FEIGELSON, 2002). O sistema de adesão das selectinas está bem estabelecido na interface materno-fetal. No lado do blastocisto a L-selectina tem sido observada, enquanto que no lado materno a expressão dos ligantes da selectina, como MECA-

79 ou HECA-452, está aumentada durante a janela de implantação (GENBACEV et al., 2003).

A imunoreatividade do ligante MECA-79 da L-selectina parece ser mais forte no lúmen epitelial do que no epitélio glandular (LAI et al., 2005). A importância fisiológica da interação entre a L-selectina e seus ligantes oligossacarídeos foi investigada no endométrio (GENBACEV et al., 2003) e nas células trofoblásticas, sugerindo que este processo possa constituir o passo inicial da implantação do blastocisto (FAZLEABAS e KIM, 2003). A função da L-selectina é regulada por uma variedade de mecanismos, incluindo transcrição genética e associações com ação no citoesqueleto, além de sua distribuição topográfica por aumento ou diminuição da superfície livre da célula. Apesar dos avanços das pesquisas, pouco se sabe sobre o envolvimento das selectinas na implantação embrionária, sugerindo que sua participação ocorre nos estágios iniciais, sinalizando o melhor local da implantação do blastocisto com a parede uterina (ACHACHE e REVEL, 2006).

Entre os componentes da família CAM, as imunoglobulinas são as mais extensas. A molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1 ou CD54) é uma glicoproteína transmembrana que pertence à superfamília das imunoglobulinas e é expressa na superfície de vários tipos celulares, como os fibroblastos, leucócitos, células endoteliais e epiteliais. Esta molécula é regulada pelas citocinas inflamatórias e não inflamatórias. A interação da ICAM-1 é essencial para a migração transendotelial de leucócitos e para várias funções imunológicas (VAN DE STOLPE e VAN DER SAAG, 1996).

É bem estabelecido que o endométrio, sob condições normais, contém uma grande população de leucócitos, incluindo macrófagos, linfócitos T e granulócitos,

que tem importância em muitos mecanismos fisiológicos como a decidualização (KING, 2000), menstruação e parturição (YELLON et al., 2003). Esta população de leucócitos expressa ICAM-1. Foi também demonstrado que esta molécula de adesão é expressa por outros tipos de células endometriais encontradas, tanto no epitélio quanto no estroma, sugerindo que esta proteína possa ter um papel na fisiopatologia do endométrio (DEFREIRE et al., 2005). A relação entre a expressão da ICAM-1 e perdas gestacionais recorrentes tem sido investigada, sendo identificada em células endometriais na fase lútea de pacientes com e sem perdas de gestações inexplicadas (GAFFURI et al., 2000). Embora a ICAM-1 não tenha sido mostrada ser indispensável nos passos iniciais da interação do blastocisto com o endométrio, pode participar indiretamente nesse processo por interagir com o sistema imune (GERMEYER et al., 2011).

Os genes HOX são essenciais para a proliferação, diferenciação e receptividade endometrial por mediar algumas funções dos esteróides sexuais durante cada ciclo reprodutivo. O RNAm do HOXA-10 e HOXA-11 estão expressados nas células epiteliais e no estroma endometrial, principalmente nas fases secretoras média e tardia, permanecendo em altos níveis após a implantação embrionária (CAKMAK e TAYLOR, 2011). Alguns marcadores morfológicos e moleculares específicos da janela de implantação são regulados pelos gens HOX, como os pinopódios, a $\beta 3$ -integrina e a IGFBP-I (NIKAS e AGHAJANOVA, 2002).

Várias doenças benignas incluindo a SOP estão associadas com a diminuição da fecundidade cíclica e receptividade uterina (DONAGHAY e LESSEY, 2007; CAKMAK e TAYLOR, 2011). Apesar dos avanços tecnológicos desenvolvidos nas técnicas de reprodução assistida, permitindo a seleção de embriões de alta

qualidade, a taxa de implantação continua baixa e não tem aumentado suficientemente nas últimas décadas (GREGORY et al., 2002; CAKMAK e TAYLOR, 2011). A receptividade uterina tem um papel chave no estabelecimento da gravidez. Quando alterada, pode limitar o sucesso das técnicas de reprodução assistida e contribuir para a infertilidade em certas doenças ginecológicas, como a síndrome dos ovários policísticos (DONAGHAY e LESSEY, 2007).

1.3 Endométrio na “janela de Implantação” na síndrome dos ovários policísticos

Em mulheres com SOP, que são anovulatórias ou oligoovulatórias, o papel regulatório da progesterona está muito reduzido ou ausente, e isto resulta na constante não oposição da ação estrogênica no endométrio (GIUDICE, 2006; CAKMAK e TAYLOR, 2011). Assim, o crescimento e diferenciação do endométrio em mulheres com SOP são influenciados pelos andrógenos, insulina e os estrógenos sem a oposição da progesterona. Na ausência de ovulação e dos efeitos da regulação da progesterona, o endométrio não sofre uma transformação secretória e está constantemente exposto aos efeitos estimulantes e mitogênicos do estradiol, que pode levar ao crescimento excessivo do endométrio, padrões de sangramento imprevisíveis, hiperplasia e câncer (GIUDICE, 2006).

O endométrio de mulheres com SOP é considerado como modelo de endométrio disfuncional, ocorrendo superexpressão de receptores androgênicos e falha em regular os receptores estrogênicos (REs) quando comparadas às mulheres

controle férteis (GREGORY et al., 2002). Estudos realizados na SOP demonstram diferenças nos complementos dos receptores esteróides e coativadores quando comparadas com mulheres férteis. O endométrio, nesse caso, superexpressa os receptores androgênicos e falha a regulação do RE- α na janela de implantação (GREGORY et al., 2002; APPARAO et al., 2002; WANG et al., 2011)

A SOP apresenta outras características comuns além do hiperandrogenismo e disfunção ovulatória que não estão incluídas nos critérios diagnósticos já estabelecidos, como a secreção anormal das gonadotrofinas, resistência à insulina e anormalidades metabólicas (dislipidemias). A expressão aumentada dos coativadores AIB1 (coativador 3 do receptor nuclear) do receptor do estrogênio e TIF2 (fator 2 intermediário transcricional) pode acentuar a atividade do estrogênio nas células endometriais da SOP (GREGORY et al., 2002).

Os dados existentes na literatura não são muito claros se na SOP existe uma disfunção endometrial independente da ação da progesterona. Alguns estudos indicam que o processo endometrial, incluindo a proliferação celular, diferenciação celular e a resposta celular ao estímulo biológico, poderiam ser afetados por outros fatores como citocinas e fatores de crescimento, explicando, em parte, os resultados pobres reprodutivos neste grupo de mulheres (DONAGHAY e LESSEY, 2007).

Existe um aumento evidente da expressão desregulada de marcadores da receptividade uterina no endométrio de mulheres portadoras da SOP. Estudos mostraram que em pacientes ovulatórias com SOP, a α -v β -3 integrina, HOXA-10, HOXA-11 e a expressão da proteína ligadora do fator de crescimento insulina símile (IGFBP-I) está diminuída durante a fase secretora (APPARAO et al., 2002; CERMIK et al., 2003; DAFTARY et al., 2007; CAKMAK e TAYLOR, 2011).

Considerações da literatura sobre a expressão e regulação da integrina $\alpha V \beta 3$ demonstraram que esta proteína pode representar marcador do processo de implantação humana (LESSEY, 2011).

A expressão do HOXA-10, *in vitro*, se mostrou diretamente diminuída pela testosterona, sugerindo que a diminuição dos androgênios poderia melhorar a receptividade endometrial (CAKMAK e TAYLOR, 2011). Estudos têm demonstrado diminuição da expressão da $\alpha v \beta 3$ -Integrina e superexpressão de marcadores da atividade estrogênica (Cyr61) na janela de implantação (MACLAUGHLAN et al., 2007).

Outros estudos mostraram, também, que a disfunção na implantação estaria relacionada com alterações disfuncionais endometriais nas mulheres com SOP (DONAGHAY e LESSEY, 2007; BELLVER et al., 2011), deixando lacunas no conhecimento se a administração da progesterona poderia modificar a estrutura morfológica de forma significativa, com impacto na expressão das moléculas de adesão, cuja importância já é estabelecida para o sucesso da implantação do embrião no endométrio.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a histomorfometria endometrial e a imunoexpressão de moléculas de adesão no endométrio de mulheres com ciclos menstruais regulares, na fase proliferativa e na “janela de implantação” do ciclo menstrual, e de mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos antes e durante o uso da progesterona.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Comparar a histomorfometria do endométrio de mulheres com ciclos menstruais regulares na fase proliferativa e na janela de implantação do ciclo menstrual com o endométrio de mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos, antes e durante o uso da progesterona.

2.2.2 Comparar a imunoexpressão do ligante MECA-79 da L-selectina no endométrio na fase proliferativa e na janela de implantação de mulheres com ciclos menstruais regulares com o endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos, antes e durante o uso da progesterona.

2.2.3 Comparar a imunoexpressão da $\alpha V\beta 3$ -Integrina no endométrio na fase proliferativa e na janela de implantação de mulheres com ciclos menstruais regulares com o endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos, antes e durante o uso da progesterona.

2.2.4 Comparar a imunoexpressão da E-caderina no endométrio na fase proliferativa e na janela de implantação de mulheres com ciclos menstruais regulares com o endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos, antes e durante o uso da progesterona.

2.2.5 Comparar a imunoexpressão da imunoglobulina ICAM-1 no endométrio na fase proliferativa e na janela de implantação de mulheres com ciclos menstruais regulares com o endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos, antes durante o uso da progesterona.

3.1 Casuística

3.1.1 Tipo de estudo

O estudo foi do tipo observacional, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP nº 0164/09) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e do Hospital Getúlio Vargas da Universidade Federal do Piauí (HGV/UFPI), sendo conduzido no setor de Reprodução Humana do HGV/UFPI no período de 01 de abril de 2009 a 31 de agosto de 2011.

3.1.2 Tamanho amostral e seleção das pacientes

A população do estudo consistiu de 80 mulheres com idade variando de 18 a 35 anos, sendo divididas em dois grupos: Grupo SOP (N=40), com diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos de acordo com os critérios da AEPCOS (AZZIZ, 2006; DIAMANTI-KANDARAKIS e DUNAIF, 2012), e o grupo controle (N=40), formado por mulheres saudáveis, com ciclos menstruais regulares, com prole de pelo menos um filho, tubas uterinas ligadas e cadastradas no setor de reprodução humana do HGV para a realização de recanalização tubária cirúrgica.

3.1.3 Critérios de elegibilidade

3.1.3.1 Critérios de inclusão

❖ **Para as mulheres do grupo SOP:**

- Hiperandrogenismo (clínico e/ou bioquímico) e disfunção ovariana indicada por oligoanovulação e/ou ovários policísticos (APCOS);
- Idade reprodutiva de 18 a 35 anos;
- Não ter feito uso de medicamentos hormonais nos três meses que precederam o estudo;
- As que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

❖ **Para o grupo controle, mulheres:**

- Saudáveis, com idade entre 18 a 35 anos, comprovadamente férteis (pelo menos um filho), ciclos menstruais regulares, trompas uterinas ligadas e cadastradas no protocolo do Serviço para realizar recanalização tubária cirúrgica;
- Não ter feito uso de medicamentos hormonais nos três meses que antecederam o estudo;
- As que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1.3.2 Critérios de não inclusão

❖ **Para as mulheres do grupo SOP e Controle:**

- Idade menor do que 18 anos e maior do que 35 anos;
- Etilismo e tabagismo;

- Com doenças sistêmicas, doenças sexualmente transmissíveis, tumores uterinos, cistos ou tumores ovarianos;
- Portadoras de outras doenças endócrinas;
- Em uso de corticóides ou medicações para infertilidade nos três meses que antecederam o estudo;
- Que não aceitaram participar do estudo.

Foram excluídas 11 pacientes dos dois grupos pelos seguintes motivos: material insuficiente para a análise histológica, não comprovação do ciclo ovulatório nas do grupo controle através da biópsia endometrial ou pela dosagem de progesterona na fase lútea média. Portanto, foram incluídas um total de 69 pacientes para a avaliação histomorfométrica do endométrio e das moléculas de adesão (Ligante MECA 79 da L-selectina, α v- β 3-Integrina, E-caderina e ICAM-1), sendo que permaneceram no grupo SOP 34 mulheres e no grupo controle 35 mulheres com ciclos regulares (Figura 3).

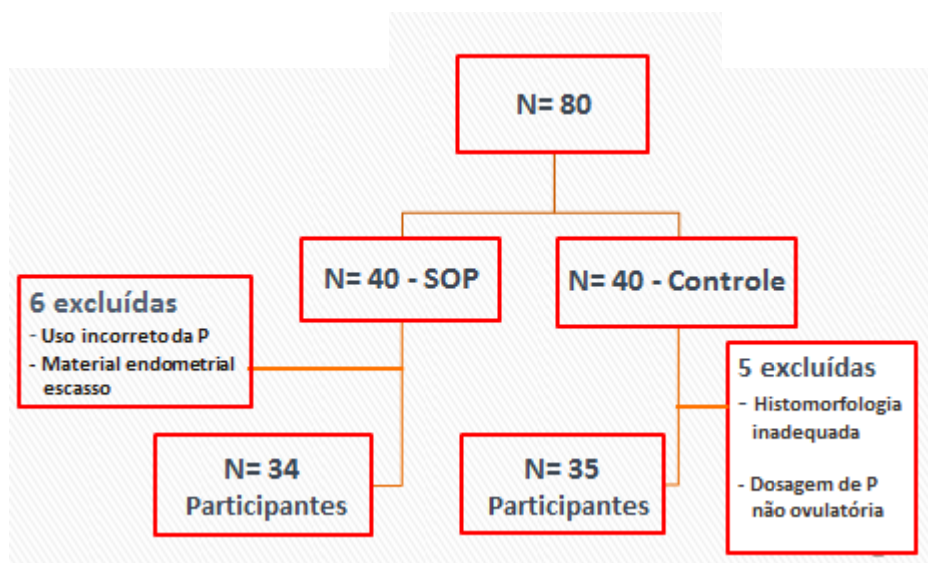


Figura 3 – Fluxograma do Estudo

Foram coletados 68 e 70 espécimes endometriais, respectivamente. Todas as participantes foram submetidas a uma anamnese detalhada, exame físico com avaliação do índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal (CA) e circunferência do quadril (CQ), exame ginecológico (incluindo o exame de Papanicolaou), ultrassonografia pélvica transvaginal e histerossalpingografia. Foram coletados, também, dados antropométricos, tais como estatura e peso.

A circunferência abdominal foi medida na menor região localizada entre o último arco costal e a crista ilíaca. Já a circunferência de quadril foi aferida na área de maior protuberância dos glúteos. O hiperandrogenismo clínico foi evidenciado pela presença de hirsutismo, classificado de acordo com o índice proposto por FERRIMAN e GALLWEY (1961). Pacientes com índice igual ou superior a 8 foram consideradas hirsutas.

Nenhuma paciente do grupo controle apresentava sintomas de hiperandrogenismo, história de disfunção menstrual, infertilidade ou sinais ultrassonográficos de SOP.

As mulheres do grupo SOP realizaram as dosagens séricas de TSH, T4 livre, FSH/LH, testosterona livre e total, androstenediona, cortisol, prolactina, sulfato de dehidroepiandrosterona (S-DHEA), 17-alfa-hidroxi-progesterona (17- α -OH-P), insulina de jejum, glicemia de jejum, teste oral de tolerância a glicose após 2 horas (TOTG), B-HCG e globulina carreadora dos hormônios sexuais (SHBG).

Os espécimes endometriais das pacientes dos dois grupos foram obtidos do corpo do útero, utilizando-se um cateter Pipelle de Cornier (Laboratoire CCD, Paris, France). As pacientes do grupo SOP que não menstruavam (por serem a maioria anovulatórias), a 1ª biópsia do endométrio não foi programada para nenhuma época

específica do ciclo, tendo sido realizada logo após o resultado do B-HCG negativo e da ultrassonografia transvaginal. A 2ª biópsia, nessas mulheres foi efetuada no 10º dia do uso da progesterona micronizada (UTROGESTAN®, FMQ, 200mg/comp/dia), correspondendo ao período da fase secretora média. Nas mulheres com SOP que menstruavam, essa 1ª biópsia foi programada para o 9º dia do ciclo (fase proliferativa), iniciando o uso da progesterona oral micronizada no 14º dia e a 2ª biópsia foi realizada, também, no 10º dia do uso progesterona, correspondendo ao 23º dia do ciclo menstrual.

As pacientes do grupo controle fizeram a 1ª biópsia na fase proliferativa (9º dia do ciclo) e a 2ª biópsia no 23º dia, ou seja, na fase secretora média do ciclo menstrual, que corresponde ao período da "janela de implantação". Na manhã da 2ª biópsia foi também coletada uma amostra de sangue venoso periférico, em jejum, para a dosagem de progesterona sérica, sendo considerada como ciclo ovulatório níveis ≥ 10 ng/ml (USADI et al., 2008; KILIC et al., 2008).

3.2 Métodos

3.2.1 Análise histomorfométrica

As amostras endometriais de cada paciente foram fixadas em formaldeído a 10% (tampão fosfato) por 12 horas e depois processados para a inclusão histológica em parafina, sendo obtidos cortes de 4 μ m que foram corados pela hematoxilina e eosina (H.E.) para posterior análise morfológica, visando à confirmação da fase do ciclo menstrual (proliferativa e secretora), utilizando os critérios propostos por NOYES et al.(1975). As medidas morfométricas (número de glândulas, relação

glândula/estroma e número de vasos) foram realizadas em microscópio de luz (Carl Zeiss) e ocular de 10X contendo retículo de Weibel de 25 pontos (Carl Zeiss), já a espessura do epitélio superficial foi realizada com o auxílio de ocular de morfometria Kpl 10x (Carl Zeiss). O número médio das glândulas endometriais e dos vasos sanguíneos foram determinados em 20 campos/lâmina e a espessura em 20 campos/lâmina, onde o epitélio se mostrava mais delgado. Dois avaliadores independentes mediram o total de áreas do epitélio luminal e glandular em duas diferentes ocasiões.

3.2.2 Análise imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica das moléculas de adesão, secções de 5 µm foram inicialmente submetidos a desparafinização em microondas em um tampão de citrato de sódio (pH 6,0) durante 8 minutos, a fim de recuperar o antígeno. Depois do tratamento com 0,1% de Triton X-100 durante 10 minutos, a atividade peroxidase endógena foi bloqueada com 0,3% de H₂O₂ em metanol durante 30 min. A ligação do anticorpo não específico foi bloqueada com soro de cabra normal (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As secções foram então incubadas durante a noite com o anticorpo primário a 4-8 ° C (E-Caderina, ICAM-1, L-selectina (MECA-79) e αvβ3-integrina (IMUNY, Rheabiotech Ltda, Brasil). Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário, anticorpo de coelho anti-IgG de galinha (1:800, Dako Cytomation) durante 15 minutos. Os produtos de reacção foram visualizados utilizando 3,3'-diamino-benzidina (DAB, Sigma Chemical Co). O controle negativo foi preparado por

incubação de secções de coelho fracção de imuno-globulina inespecífica (Dako Cytomation) em vez do anticorpo primário. As secções foram contrastadas com hematoxilina. Depois disso, as imagens foram capturadas com um microscópio de luz Axiolab Standard 2.0 (Carl Zeiss) acoplado à uma câmara de vídeo de alta resolução AxioCamMRC (Carl Zeiss) e software de análise de imagem (AxioVision Rel. 4.8.2 - Carl Zeiss). Depois disso, a imagem foi analisada e a expressão foi quantificada de acordo com a intensidade da cor no campo de análise de software Image J Pro Plus.

As células epiteliais foram marcadas como negativas se as células imunopositivas não estavam presentes depois de imunocoradas. O escore total foi baseado sobre a percentagem de células epiteliais positivas e o grau de intensidade da imunorreacção. A percentagem de células epiteliais foi graduada como se segue: nenhuma célula marcada (Grau 0), 1–25% células marcadas (grau 1), 26–50% células marcadas (grau 2), 51–75% células marcadas (grau 3), e 76–100% células marcadas (grau 4) na área representativa. A percentagem aproximada de células imunopositivas foi estimada baseada em 10 campos representativos. A intensidade da imunorreacção teve escore negativo (0), fraco (1), moderado (2) ou forte/intenso (3) (PANZAN et al., 2011). A análise das lâminas foi realizada por dois observadores experientes que estavam cegados para todas as lâminas avaliadas. Depois de completo o estudo, os mesmos avaliadores reexaminaram as lâminas para assegurar a reprodutibilidade da avaliação semi-quantitativa. O índice total foi calculado usando a formula: índice total = (percentagem de células positivas) x (intensidade da imunorreacção). Esta análise semi-quantitativa tem sido mostrada por apresentar um erro baixo intra e inter- observador (LESSEY et al., 2000).

3.3.3 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio \pm desvio padrão (DP) demonstrados em análise descritiva e para tanto foi utilizado o Programa GraphPad Prism®, versão 5.0, para Windows XP (GraphPad Software, San Diego).

Os dados obtidos foram analisados conforme a distribuição de normalidade pelo teste de Barlett e após este se aplicou o teste t de Student, não pareado, se a distribuição fosse normal ou Mann-Whitney se a distribuição fosse heterogênea. Fixou-se em 5% ($p < 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes. O poder da amostra (Power calculation) foi fixado para 85% ($\beta = 15\%$) em 25 por grupo.

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Elsevier Editorial System(tm) for Fertility and Sterility
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS AND MARKERS OF ENDOMETRIAL RECEPTIVITY
EMBRYONIC IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME DURING THE TREATMENT WITH
MICRONIZED PROGESTERONE

Article Type: Case-Control Study

Keywords: cell-adhesion molecules; female infertility; endometrium; embryo implantation; polycystic
ovary syndrome.

Corresponding Author: Professor Jose Maria Soares-Jr, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of São Paulo

First Author: Ione Maria R Soares Lopes, MD, PhD

Order of Authors: Ione Maria R Soares Lopes, MD, PhD; Carla C Magalhães, MD, PhD; Margareth C Iwata,
MD, PhD; Ricardo S Simões, MD, PhD; Manuel J Simões, MD, PhD; Edmund C Barakat, MD, PhD; Jose
Maria Soares-Jr, MD, PhD

Abstract: OBJECTIVE: To assess the histomorphometry and expression of adhesion molecules in the
endometrium of fertile and infertile women with polycystic ovary syndrome (PCOS) treated with
progesterone.

DESIGN: Prospective case-control study.

SETTING: Federal University of São Paulo, Brazil.

PATIENTS: Fertile and infertile women with PCOS participated in the study.

INTERVENTION(S): Endometrial biopsy was performed in women with PCOS and the for
histomorphometric analysis and measurement of adhesion molecules.

MAIN OUTCOME MEASURE(S): Assessment of the endometrial histomorphometry and
immunohistochemical expression of $\alpha v \beta 3$ integrin, MECA-79, E-cadherin, and intercellular adhesion
molecule 1 (ICAM-1).

RESULTS: During the administration of progesterone, the endometrium of the women with PCOS
exhibited a lower number of endometrial glands and thicker luminal epithelium compared with the
control group in the secretory phase ($p < 0.01$). In addition, the PCOS group exhibited reduced
immunoreexpression of $\alpha v \beta 3$ integrin and MECA-79 compared with the control group during the
secretory phase ($p < 0.01$). The expression of E-cadherin was higher in the PCOS group during
treatment with progesterone ($p < 0.05$) and the expression of ICAM-1 was lower compared with the
control group during the proliferative phase ($p < 0.05$).

CONCLUSION(S): Conventional doses of micronized progesterone did not correct the modifications of
the histomorphology and receptivity markers of the endometrium of women with PCOS.

Suggested Reviewers: Dr. Alexandre Guilherme Z Rossi
Faculty of Medicine Jundiaí
agzrossi@hotmail.com

Dra. Angela Maggio da Fonseca
University of São Paulo
am.fonseca@uol.com.br

Opposed Reviewers:

*Cover Letter

São Paulo, December 26, 2012.

Dear Craig Niederberger, M.D., and Antonio Pellicoer, M.D.

Editors-In-Chief, Fertility and Sterility®

American Society for Reproductive Medicine (ASRM)

1209 Montgomery Highway

Birmingham, AL 35216

We would like to submit our manuscript ***HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS AND MARKERS OF ENDOMETRIAL RECEPTIVITY EMBRYONIC IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME DURING THE TREATMENT WITH MICRONIZED PROGESTERONE*** All authors agreed with this version of manuscript.

Sincerely,

José Maria Soares Júnior

Gynecology Department

Federal University of São Paulo

*Manuscript
[Click here to view linked References](#)

Running title: ENDOMETRIUM IN POLYCYSTIC OVARIES

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS AND MARKERS OF ENDOMETRIAL
RECEPTIVITY EMBRYONIC IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY
SYNDROME DURING THE TREATMENT WITH MICRONIZED PROGESTERONE

Ione Maria Ribeiro Soares Lopes^a, Carla Cristina Maganhin^a, Margareth Chiharu
Iwata^a, Ricardo Santos Simões^b, Manuel de Jesus Simões^a, Edmund Chada
Baracat^b, José Maria Soares-Jr^a

^a – Gynecology Department, Federal University of São Paulo (UNIFESP) – São
Paulo/SP, Brazil.

^b – Gynecology and Obstetric Department, University of São Paulo (USP) – São
Paulo/SP, Brazil.

Correspondent author:

José Maria Soares Júnior

Rua Sena Madureira, 1245 – Apto 11

São Paulo (SP) – CEP 04021-051

e-mail: jsoares415@hotmail.com

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Capsule

The conventional dose of micronized progesterone may not revert the alterations in the histomorphology and receptivity markers of the endometrium of women with PCOS

ABSTRACT

OBJECTIVE: To assess the histomorphometry and expression of adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women with polycystic ovary syndrome (PCOS) treated with progesterone.

DESIGN: Prospective case-control study.

SETTING: Federal University of São Paulo, Brazil.

PATIENTS: Fertile and infertile women with PCOS participated in the study.

INTERVENTION(S): Endometrial biopsy was performed in women with PCOS and the for histomorphometric analysis and measurement of adhesion molecules'.

MAIN OUTCOME MEASURE(S): Assessment of the endometrial histomorphometry and immunohistochemical expression of $\alpha v\beta 3$ integrin, MECA-79, E-cadherin, and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1).

RESULTS: During the administration of progesterone, the endometrium of the women with PCOS exhibited a lower number of endometrial glands and thicker luminal epithelium compared with the control group in the secretory phase ($p < 0.01$). In addition, the PCOS group exhibited reduced immunoexpression of $\alpha v\beta 3$ integrin and MECA-79 compared with the control group during the secretory phase ($p < 0.01$). The expression of E-cadherin was higher in the PCOS group during treatment with progesterone ($p < 0.05$) and the expression of ICAM-1 was lower compared with the control group during the proliferative phase ($p < 0.05$).

CONCLUSION(S): Conventional doses of micronized progesterone did not correct the modifications of the histomorphology and receptivity markers of the endometrium of women with PCOS.

KEYWORDS: cell-adhesion molecules, female infertility, endometrium, embryo implantation, polycystic ovary syndrome.

INTRODUCTION

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder among women (1). Its clinical expression is variable and usually includes oligoovulation or anovulation, (clinical and/or biochemical) hyperandrogenism, and polycystic ovaries on ultrasound (1-5). PCOS-associated infertility was attributed to the effects of obesity and/or metabolic disorders, including inflammatory cytokines, growth factors, increased androgen production, and partial decreases of follicle-stimulating hormone (FSH), which result in anomalous ovulatory growth and inadequate oocyte quality (1,6). In addition to those factors, some data indicate that failure of blastocyst implantation in the endometrium may also cause infertility in the affected women (7,8). Although ovulation is achieved using drugs in in vitro fertilization (IVF), the implantation rates remain very low despite the excellent quality of the transferred embryos (8,9). Therefore, anovulation may not be the single cause of infertility (10); endometrial receptivity may play a crucial role in the establishment and development of pregnancy in women with PCOS (7,10). Nevertheless, data on the endometrium of women with PCOS, especially during the implantation window, are scarce.

Some evidence suggests dysregulated expression of known endometrial receptivity markers in women with PCOS. A large number of molecular mediators influenced by the ovarian hormones were postulated to intervene in the implantation (11), such as adhesion molecules including integrins, L-selectins, E-cadherines, and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (12,13). The exact function of each molecular mediator (10, 11) is unknown, especially during the implantation window,

which is the most critical period of the maternal-fetal interaction. In fact, $\alpha v\beta 3$ integrin is reduced in patients with PCOS during the late secretory phase (10, 14, 15); however, other authors did not observe this phenomenon (16).

L-selectin plays an important role in human implantation (17). The adhesion system of selectins is well established at the maternal-fetal interface and plays a larger role in the blastocyst apposition stage. L-selectin was observed on the blastocyst side, and on the maternal side, the expression of the selectin ligand MECA-79 increases during the "implantation window". Margarit et al. (18) found lower immunoreactivity of the L-selectin ligands located at the endometrium of lumen of patients with PCOS. In addition, there are few studies in the literature on the cell adhesion molecules E-cadherin and ICAM-1 in the endometrium of patients with PCOS. E-cadherin is regulated by calcitonin, which is induced by progesterone (11). Adhesion interactions are crucial for transendothelial migration of leukocytes and several other immune functions (11,19). The leukocyte population expresses ICAM-1 at the endometrium and ICAM-1 interferes with the immune system. Some evidence suggests that low-grade chronic inflammation and endothelial dysfunction are involved in the pathogenesis of PCOS (20) and insulin resistance (21).

We aimed this study to establish whether progesterone replacement suffices to maintain the PCOS endometrium in an appropriate state together with the elements that may influence the maternal-fetal interaction during the implantation window.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The present study was a prospective, open label study approved by the research ethics committees of Federal University of São Paulo (Comitê de Ética em Pesquisa - CEP nº 0164/09) and Getúlio Vargas Hospital of Federal University of Piauí (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/ Hospital Getúlio Vargas - HGV). The study was conducted at the Human Reproduction section of HGV from April 1 2009 to August 31 2011.

The study population included 80 women aged 18 to 35 years old who met the inclusion criteria: in the PCOS group (N = 40), the diagnosis of PCOS was performed according to the criteria proposed by the Androgen Excess and PCOS Society (AE-PCOS) (2006) (4). Women with other causes of hyperandrogenism or anovulation were excluded using appropriate tests, and participants had not used hormonal or other drugs in the three months prior to the study. Women with systemic diseases, sexually transmitted diseases, uterine tumors, ovarian cysts or tumors, other endocrine disorders in addition to PCOS, or using statins, corticoids, or infertility drugs in the three months prior to the study were excluded. The control group (N = 40) comprised healthy women aged up to 35 years old with confirmed fertility (one child at least) and tubal ligation registered at the institution to perform surgical reversal.

From the 80 participants, the material was insufficient in 11 participants. Therefore, 69 women were included in our study on histomorphometric assessment of the endometrium and adhesion molecules (MECA-79, $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin, E-cadherin, and ICAM-1). The PCOS group comprised 34 participants (68 specimens), and the

control group comprised 35 fertile women (70 specimens). All participants were subjected to a detailed clinical interview, a physical examination, including assessment of the body mass index (BMI), waist circumference (WC), and hip circumference (HC), and a gynecological examination including the Papanicolaou test, transvaginal pelvic ultrasound, and hysterosalpingography.

Anthropometric data were collected including height, weight, WC, HC, and BMI. WC was measured at the narrowest area between the last rib and the iliac crest and the HC at the most prominent point of the gluteal area. Clinical hyperandrogenism was established by the presence of hirsutism, which was established by the score suggested by FERRIMAN and GALLWEY (22); the patients with scores equal to or higher than eight were considered to be hirsute.

The serum levels of thyroid-stimulating hormone, free thyroxine, FSH/LH, free and total testosterone, androstenedione, cortisol, prolactin, dehydroepiandrosterone sulfate, 17-alpha-hydroxy-progesterone (17- α -OHP), fasting insulin, fasting glycemia, two-hour oral glucose tolerance test (OGTT), beta human chorionic gonadotropin (B-hCG), and sex hormone-binding globulin (SHBG) were measured in the women in the both group.

Endometrial specimens from the participants in both groups were collected using the Pipelle de Cornier catheter (Laboratoire CCD, Paris, France) to collect endometrial fragments from the uterine body. Most of the participants in the PCOS group were anovulatory, and thus, the first endometrial biopsy was performed without regard for the cycle phase after a negative B-hCG result and a transvaginal ultrasound. After oral micronized progesterone (UTROGESTAN®, FMQ, 200 mg/caps/day) and menstrual period, the biopsy was scheduled for cycle day 9th

(proliferative phase) in PCOS and control women, respectively. The second biopsy was performed on day 10 of the use of progesterone and on cycle day 23, on the midsecretory phase of the menstrual cycle (implantation window) for PCOS and control women, respectively. On the morning of the day the second biopsy was performed, a sample of peripheral venous blood was collected to measure the serum progesterone level (23, 24).

Histomorphometric analysis

The endometrial samples were processed for histological routine and 4- μ m slices were stained with hematoxylin-eosin (HE) for morphological analysis and confirming the menstrual cycle phase (proliferative and secretory) using the criteria suggested by Noyes (25). The morphometric measurements (number of glands, gland/stroma ratio, and number of vessels) were performed under a light microscope (Carl Zeiss) and 10X ocular lens with 25-point Weibel reticle (Carl Zeiss), and the superficial epithelial thickness was measured using a 10x eyepiece (Carl Zeiss). The mean number of endometrial glands and blood vessels was measured in 20 fields/slide, and the thickness was measured in 20 fields/slide in the area where the endometrium was thinnest. Two independent examiners (blind to information of groups) measured the total luminal and glandular epithelial areas on two different occasions.

Immunohistochemical analysis

To perform immunohistochemical analysis of the adhesion molecules, 5- μ m slices were initially subjected to microwave deparaffinization in sodium citrate buffer (pH 6.0) for eight minutes for antigen recovery. Following treatment with 0.1% Triton X-100 for 10 min, the endogenous peroxidase activity was blocked using 0.3% H₂O₂ in methanol for 30 min. Nonspecific antigen binding was blocked using normal goat serum (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories) for 20 min at room temperature. The sections were incubated overnight with the primary antibody (E-cadherin, ICAM-1, L-selectin (MECA-79), and α v β 3 integrin) (IMUNY, Rheabiotech Ltda, Brazil) at 4-8 °C. Following rinsing with phosphate-buffered saline (PBS), the sections were incubated with the secondary antibody, chicken anti-rabbit IgG (1:800, DakoCytomation), for 15 min. The reaction products were visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co). The negative control was prepared by incubating sections of rabbit nonspecific immunoglobulin fraction (DAKO Cytomation) instead of the primary antibody and staining the sections with hematoxylin. The images were acquired using a light microscope AxioVision Rel 4.6 (Carl Zeiss) coupled to AxioCamMRC (Carl Zeiss) and a high-resolution video camera (Carl Zeiss) with image analysis software (Axio-Vision REL 4.6; Carl Zeiss).

The epithelial cells were considered negative when no immunopositive cells were present following immunostaining. The total score was based on the percentage of positive epithelial cells and the degree of intensity of the immunoreaction. The percentage of epithelial cells was graded as follows: no

1 stained cell (Grade zero) in the representative area, 1 – 25% stained cells (Grade
2 1), 26 – 50% stained cells (Grade 2), 51 – 75% stained cells (Grade 3), and 76 –
3 100% stained cells (Grade 4). The approximate percentage of immunopositive cells
4
5 was estimated based on 10 representative fields. The intensity of the
6
7 immunoreaction was classified as negative (zero), weak (1), moderate (2), or
8
9 strong/intense (3) (25). The slides were analyzed by two experienced observers
10
11 blinded to the provenance of all assessed slides. Once the study was finished, the
12
13 same examiners reassessed the slides to establish the reproducibility of the
14
15 semiquantitative assessment. The total index was calculated according to the
16
17 following equation: total index = (percentage of positive cells) x (intensity of
18
19 immunoreaction). The semiquantitative analysis technique was shown to exhibit low
20
21 intra- and interexaminer error (27).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 Statistical analysis

34
35
36
37
38 The resulting data were analyzed using Kolmogorov-Smirnov's test followed by
39
40 unpaired Student's t-test or Mann-Whitney test when the distribution was normal or
41
42 heterogeneous, respectively. The level to reject the null hypothesis was established
43
44 as 5% ($p < 0.05$). The sample size needed for 85% of power ($\beta = 15\%$) was
45
46 calculated as 25 per group.
47
48
49
50
51
52

53 RESULTS

54
55 The demographic and clinical characteristics of the investigated women are
56
57 described in Table 1. There was no statistical difference between the both groups
58
59
60
61
62
63
64
65

in regard to age, age at menarche, and socioeconomic level. The participants with PCOS exhibited a lower number of menstrual cycles per year), BMI , Ferriman and Galley (22) score, and WC compared with the control ($p < 0.05$).

Histomorphometric analysis of the endometrium showed that the participants with PCOS exhibited increased thickness of the luminal epithelium ($p < 0.01$), stromal and glandular development similar to the ovulatory women in the first phase, and a slightly greater number of endometrial glands, which was not statistically significant ($p = 0.36$) (Table 2). Following the administration of progesterone, the participants with PCOS exhibited presence of secretory endometrium with histological delay according to Noyes' criteria (30), less developed glands, and higher concentration of stromal component ($p < 0.01$) compared with the control group (Table 2). In regard to the blood vessels, the PCOS group exhibited greater concentration in the proliferative phase; however, following the administration of progesterone, the percentage of blood vessels was similar to the control group.

The intensity of immunohistochemical reaction of $\alpha v\beta 3$ integrin exhibited similar behavior in groups PCOS and control in the proliferative phase ($p = 0.44$), with weak reactivity in the luminal epithelium (Fig.1-E-F). During the midsecretory phase, the expression of $\alpha v\beta 3$ integrin changed, but the intensity increased in the luminal and glandular epithelial compartment. Greater concentrations of $\alpha v\beta 3$ integrin were located at the cell surface and intercellular membrane in the control group, and the difference was statistically significant compared with the PCOS group ($p < 0.01$). Following the administration of progesterone, immunoexpression was lower in the PCOS group compared with the control group (Fig.2-E - F).

The immunoreaction of the MECA-79 (L-selectin ligand) was present in all biopsy specimens from both groups and was immunolocated to a greater degree at the endometrial luminal surface and glandular epithelium predominantly at the cell membrane compared with the cytoplasm. During the proliferative phase, very little MECA-79 reactivity was observed in both groups and was slightly lower in the endometrium of the women with PCOS, but the difference was not statistically significant ($p = 0.68$) (Table 2, Fig. 1-G-H). In the PCOS group, following the progesterone administration, the immunoreaction of MECA-79 was more evident at the endometrial luminal and glandular epithelium. Although the reaction was more intense compared with the first biopsy, it was less intense compared with the participants from the control group (Fig. 2-G-H). The MECA-79 scores were significantly higher in the second biopsy of the control group compared with the PCOS group ($p < 0.01$).

The intensity of immunoreactivity to E-cadherin in the first biopsy specimens was higher in the control group compared with the PCOS group ($p < 0.05$) (Fig. 1-I-J). Following the use of progesterone, the behavior of the PCOS group was different compared with the control and did not exhibit a significant reduction, as shown in Table 2 ($p < 0.05$) and (Fig. 2-I-J). Upon comparison of the immunoexpression of ICAM-1 in the endometrial luminal and glandular epithelium, the specimens from the first biopsy (proliferative phase) exhibited significant differences between the PCOS group and the control, while the PCOS group exhibited lower scores (Table 2, Fig. 1-K-L). No immunoreactivity was detected in the negative controls of $\alpha\beta3$ integrin, MECA-79, E-cadherin, or ICAM-1 (Fig. 1 and 2 -1-2-3-4).

DISCUSSION

Despite the advances in human reproduction techniques, pregnancy rates are still low among women with PCOS (8), and the factors explaining the low rates are the subject of much research. In the present study, we investigated whether the endometrium might be a limiting factor for embryo implantation and development of pregnancy even when it is previously prepared through administration of natural progesterone. Our results suggest that the use of micronized progesterone in conventional doses does not suffice to restore the normal endometrial morphology and does not normalize the expression of proteins related to the adhesion of the embryo to the endometrial tissue. These findings may partially account for the difficulties associated with embryonic adhesion in the endometrium in women with PCOS. In this regard, other authors have also been investigating endometrial dysfunction in women with PCOS to develop new therapies to make the endometrium more adequate for implantation (9, 13, 18, 24, 28).

Following the administration of micronized progesterone, the endometrium exhibited histological changes compatible with the secretory phase compared with the control group. The endometrial thickness was greater and the number of endometrial glands was lower than the control group. The endometrium of women with PCOS was shown to be frequently dysfunctional due to increased estrogen levels (not corrected by progesterone), hyperinsulinemia, and decreased IGF binding protein 1 (IGFBP-1), which results in increased levels of free IGF-I in the bloodstream (7) to maintain the endometrium out of phase, according to Noyes and Hertig's criteria (25). We initially hypothesized that the use of progesterone (200 mg/day) for 10 days might suffice to induce appropriate endometrial transformation; however, our histological data suggest that it was not able to correct the existing

1 endometrial alterations, particularly in the upper epithelium. In addition, women with
2 PCOS may also exhibit partial deficits in the number of endometrial glands, which
3 might strengthen the hypothesis that some important histological alterations are not
4 corrected by progesterone.
5
6
7
8
9

10 The data in the literature are not clear regarding whether the endometrium of
11 women with PCOS is truly dysfunctional despite anovulation and low progesterone
12 levels. Some studies indicated that in women with PCOS, the endometrium is
13 inappropriate for implantation, including abnormal cell proliferation and
14 differentiation, and inappropriate cell response occur independently from
15 anovulation. Our data suggest that more attention should be paid to endometrial
16 transformation using progesterone in women with PCOS. Other factors may need to
17 be corrected to increase the success of assisted reproduction programs.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 During the secretory phase, endometrial differentiation, which is required for
32 implantation, is completed. Molecular and immunohistochemical techniques were
33 able to identify several biomarkers at the surface of the human endometrial luminal
34 epithelium that might be involved in the process of embryonic implantation (14, 29),
35 including $\alpha\beta3$ integrin (16, 29, 30), L-selectin (13, 15, 18, 28, 31), E-cadherin, and
36 ICAM-1 (11). Alterations of these biomarkers might account for some cases of
37 infertility without apparent cause, endometriosis, PCOS, and recurrent miscarriage
38 (13, 15). For that reason we chose them to investigate endometrial receptivity
39 following treatment with micronized progesterone.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 The endometrial secretory phase is difficult to assess in anovulatory women
54 without the use of drugs, such as clomiphene citrate (32), gonadotropins, or analogs
55 of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (33). However, these studies might be
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

criticized for using substances that could modify endometrial receptivity (33). Thus, we sought a model that could mimic the events in the endometrium when the deficient element, i.e., progesterone, is replaced. However, our results showed that although the appearance of the endometrium became more similar to the one of the controls, its histomorphology was altered along with the expression of the proteins related with embryonic adhesion.

The $\alpha v\beta 3$ integrin is one of the most well-characterized endometrial biomarkers related to infertility (15). Integrins are cell-adhesion molecules may perform several functions within the endometrial cells, possibly including participation in embryonic implantation (10, 15, 16). The integrins appear at the apex of the luminal surface as subnuclear and glandular secretory granules when the implantation window opens (15, 29) and are expressed until the onset of pregnancy, expanding into the decidua. Some studies found that $\alpha v\beta 3$ integrin is reduced in the endometrium of women with PCOS during the implantation window compared with the controls (15, 34). However, the literature is controversial because some authors found different results concerning the expression of $\alpha v\beta 3$ integrin during the luteal phase (24, 35, 36, 37).

The $\alpha v\beta 3$ integrin is considered to be a predictor of IVF success; however, a very small number of studies on this subject have been published (15, 37, 38, 39). Some studies observed dynamic variations and cyclic distributions of $\alpha v\beta 3$ integrin in the endometrium, and these changes might be induced by treatment using gonadotropins and clomiphene (24). Other studies assessing endometrial cells in vitro suggest that integrins might be regulated by cytokines and growth factors, whereas decidual formation is regulated by steroid hormones (40, 41). Therefore, other factors influenced the expression of $\alpha v\beta 3$ integrin in our sample. Some

1 authors have suggested that IGF-1, which is increased in PCOS, and other factors
2 may contribute to the excess of androgens and/or insulin (7, 42).
3

4
5 Lessey and Arnold (36) observed increases in $\alpha v\beta 3$ integrin following
6
7 exogenous administration of estrogen and progesterone during the implantation
8
9 window. Other authors, however, reported reduced $\alpha v\beta 3$ integrin expression in
10
11 patients treated with ovulation-inducing agents concomitant to rupture of the
12
13 gland/stroma structural harmony (excessive increase of the stroma) as a function of
14
15 the supraphysiological estrogen levels (37, 43, 44). Lacin et al. (35) did not find any
16
17 change in the integrins following administration of clomiphene citrate, hormonal
18
19 contraceptives, estrogen, or progesterone in patients with infertility by no apparent
20
21 cause. The main criticism of that study is that some patients considered to have no
22
23 apparent cause might have actually experienced endometriosis or some other
24
25 alterations associated with differential behavior of the integrins.
26
27
28
29
30

31
32 Our findings in the control group corroborate data reported by other authors,
33
34 namely, that the expression of MECA-79 is low during the proliferative phase and
35
36 high during the secretory phase (13,18). In addition, Foulk et al. (28) observed
37
38 reduced expression of MECA-79 in patients with repeated implantation failure.
39
40 Those data suggest that MECA-79 may be related to endometrial receptivity
41
42 disorders. According to our data, MECA-79 increased following the administration of
43
44 progesterone in women with PCOS, however, its levels were lower compared with
45
46 the control. Therefore, the administration of progesterone alone was not able to
47
48 correct the deficiency of MECA-79 in endometrial receptivity during the implantation
49
50 window. Similar to the integrins, other factors are likely involved in the expression of
51
52 MECA-79.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Loss of E-cadherin is necessary for the penetration and invasion of the
2 trophoblast into the endometrium (30) because it plays an important role in the
3 maintenance of cell coaptation (11). E-cadherin has been scarcely studied in
4 women with PCOS, and our study shows that it may prevent pregnancy in women
5 with chronic anovulation. In the present study, reduced expression of E-cadherin
6 was observed in the women with PCOS compared with the control. However, the
7 reduction was much lower following the administration of progesterone to the point
8 that the ratio was inverted in the second phase. The E-cadherin level was higher in
9 the PCOS group compared with the control. These results may indicate that the
10 dose and duration of exogenous progesterone administration were not sufficient to
11 stimulate the endometrial calcitonin and to reduce E-cadherin (45, 46). Another
12 explanation might be related to the possible influence of other factors, similar to
13 integrins and L-selectins.

14 Our findings show that the use of micronized progesterone in a dose of 200
15 mg/day for 10 days by women with PCOS did not promote the same modifications
16 of control group during the secretory phase in the immunoexpression of epithelial
17 cells or histomorphological changes. These findings may suggest the presence of
18 additional factors interfering with adequate endometrial transformation during the
19 implantation window or the need for larger doses of progesterone to correct the
20 alterations.

REFERENCES

- 1- Bart CJ, Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 2012;97:28-38-63.
- 2- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004; 81:19-25.
- 3- Franks S. Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: in defense of the Rotterdam criteria *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:786-9.
- 4- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 ;9 :4237-45.
- 5- Witchel SF, Recabarren SE, González F, Diamanti-Kandarakis E, Cheang KI, Duleba AJ, et al. Emerging concepts about prenatal genesis, aberrant

- 1 metabolism and treatment paradigms in polycystic ovary syndrome. *Endocrine*.
- 2 2012 ;42:526-34.
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9 6- Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and
- 10 oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv*. 2008;63 :39-48.
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18 7- Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine
- 19 CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20:235-44
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27 8- Cakmak H, Taylor HS. Human implantation failure: molecular mechanisms and
- 28 clinical treatment. *Human Reproduction Update*. 2011;17:242-53.
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36 9- Quezada S, Avellaira C, Johnson MC, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Evaluation
- 37 of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine
- 38 receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary
- 39 syndrome. *Fertil Steril*. 2006;85:1017-26.
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50 10-Donaghy M, Lessey BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign
- 51 gynecological disease. *Semin Reprod Med*. 2007;25:461-75.
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

- 11- Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum Reprod Update. 2006;12:731-46.
- 12- Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2000;14:815-26.
- 13- Lai TH, Shih IM, Vlahos N, Ho CL, Wallach E, Zhao Y. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. Fertil Steril. 2005;83:1297-302.
- 14- MacLaughlan SD, Palomino WA, Mo B, Lewis TD, Lininger RA, Lessey BA. Endometrial expression of Cyr61: a marker of estrogenic activity in normal and abnormal endometrium. Obstet Gynecol. 2007;110:146-54.
- 15- Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. Fertil Steril. 2011 ;98:522-9.
- 16- DuQuesnay R, Wright C, Aziz AA, Stamp GW, Trew GH, Margara RA, et al. Infertile women with isolated polycystic ovaries are deficient in endometrial expression of osteopontin but not alphavbeta3 integrin during the implantation window. Fertil Steril. 2009;91:489-99.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 17- Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* 2005; 9:255-66.
- 18- Margarit L, Taylor A, Roberts MH, Hopkins L, Davies C, Brenton AG, et al. MUC1 as a discriminator between endometrium from fertile and infertile patients with PCOS and endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:5320-9.
- 19- van de Stolpe A, van der Saag PT. Inter cellular adhesion molecule-1. *J Mol Med (Berl).* 1996; 74:13-33.
- 20- Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 ;84:4006-11.
- 21- Vural P, Kanmaz-Özer M, Doğru-Abbasoğlu S, Gedikbaşı A, Cil E, Karadağ B, et al. Lack of association between intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) polymorphisms and polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28:669-75.
- 22- Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961;4:155-62.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11 23-Usadi RS, Groll JM, Lessey BA, Lininger RA, Zaino RJ, Fritz MA, et al.
12 Endometrial development and function in experimentally induced luteal phase
13 deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93 :4058-64.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23 24- Kilic S, Hatipoglu T, Erdogan D, Elmas C, Yuksel B, Tasdemir N, et al. Impact of
24 high levels of progesterone on alpha(1)-integrin distribution in the endometrium of
25 patients with unexplained infertility. Acta Histochem. 2008;110:363-70.
26
27
28
29
30
31
32
33 25- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. Am J Obstet
34 Gynecol. 1975 May;122:262-3.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46 26- Panzan MQ, Mattar R, Maganhin CC, Simões RD, Rossi AG, da Motta EL, et al.
47 Evaluation of FAS and caspase-3 in the endometrial tissue of patients with
48 idiopathic infertility and recurrent pregnancy loss. Eur J Obstet Gynecol 2012 (in
49 press)
50
51
52
53
54
55
56
57 27- Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L, Greene W, Paulson M, Meyer WR, et al.
58 Use of integrins to date the endometrium. Fertil Steril. 2000;73:779-87.
59
60
61
62
63
64
65 28-Foulk RA, Zdravkovic T, Genbacev O, Prakobphol A. Expression of L-selectin
ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity. J Assist
Reprod Genet. 2007;24:316-21.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 29- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest.* 1992;90:188–195.
- 30- Reddy KV, Mangale SS. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function *Tissue Cell.* 2003;35:260-73.
- 31- Wang A, Ji L, Shang W, Li M, Chen L, White RE, et al. Expression of GPR30, ER α and ER β in endometrium during window of implantation in patients with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecol Endocrinol.* 2011 ;27:251-5.
- 32- Savaris RF, Groll JM, Young SL, DeMayo FJ, Jeong JW, Hamilton AE, et al. Progesterone resistance in PCOS endometrium: a microarray analysis in clomiphene citrate-treated and artificial menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 ;96:1737-46.
- 33- Lai TH, Zhao Y, Shih leM, Ho CL, Bankowski B, Vlahos N. Expression of L-selectin ligands in human endometrium during the implantation window after controlled ovarian stimulation for oocyte donation. *Fertil Steril.* 2006 ;85:761-3.

- 1 34- Cermik D, Selam B, Taylor HS. Regulation of HOXA-10 expression by
2 testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary
3 syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88:238-43.
4
5
6
7
8
9
10
- 11 35- Lacin S, Vatansever S, Kuscü NK, Koyuncu F, Ozbilgin K, Ceylan E.
12 Clomiphene citrate does not affect the secretion of alpha3, alphaV and beta1
13 integrin molecules during the implantation window in patients with unexplained
14 infertility. Hum Reprod. 2001;16:2305-9.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
- 24 36- Lessey BA, Arnold JT. Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the
25 establishment of uterine receptivity. J Reprod Immunol. 1998 ;39:105-16.
26
27
28
29
30
31
32
33
- 34 37- Thomas K, Thomson A, Wood S, Kingsland C, Vince G, Lewis-Jones I.
35 Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the
36 association with subsequent treatment outcome. Fertil Steril. 2003;80:502-7.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
- 46 38- Casals G, Ordi J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Casamitjana R, et al.
47 Osteopontin and alphavbeta3 integrin as markers of endometrial receptivity: the
48 effect of different hormone therapies. Reprod Biomed Online. 2010 ;21:349-59.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 39- Revel A, Haimov-Kochman R, Porat A, Lewin A, Simon A, Laufer N, et al. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection success rates with cryopreserved sperm from patients with malignant disease. *Fertil Steril*. 2005 ;84:118-22.
- 40- Grosskinsky CM, Yowell CW, Sun J, Parise LV, Lessey BA. Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 ;81:2047-54.
- 41- Sillem M, Prifti S, Schmidt M, Rabe T, Runnebaum B. Endometrial integrin expression is independent of estrogen or progestin treatment in vitro. *Fertil Steril*. 1997;67:877-82.
- 42- Apparao KB, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA, Lessey BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol Reprod*. 2002;66:297-304.
- 43- Musso C, Cochran E, Moran SA, Skarulis MC, Oral EA, Taylor S, et al. Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): a 30-year prospective. *Medicine*. 2004;83:209-22.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
 - 61
 - 62
 - 63
 - 64
 - 65
- 44- Creus M, Balasch J, Ordi J, Fàbregues F, Casamitjana R, Quinto L, et al.
Integrin expression in normal and out-of-phase endometria. Hum Reprod.
1998;13:3460-8.
- 45- Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. Rev Reprod. 1997;2 :84-93.
- 46- Aplin JD, Singh H. Bioinformatics and transcriptomics studies of early
implantation. Ann N Y Acad Sci. 2008;1127:116-20.

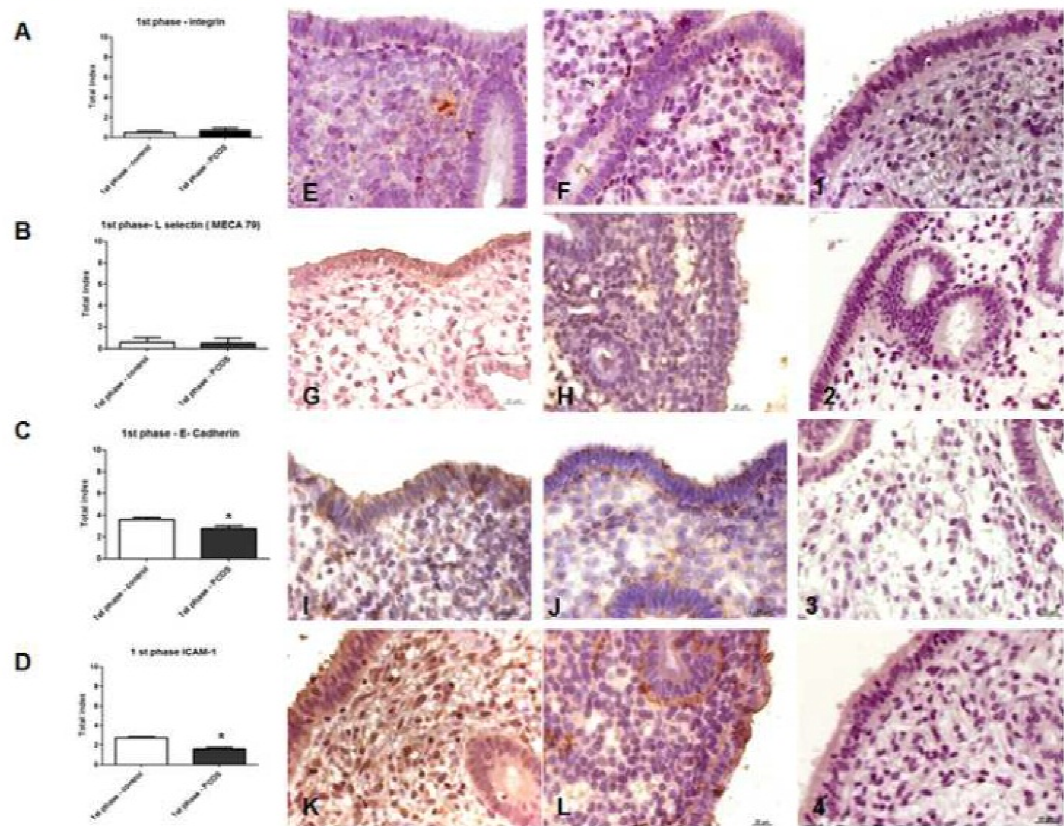
Figure

Fig. 1. Graphic representation of the total index: (A) The expression of $\alpha v\beta 3$ Integrin was similar in both groups; (B) The expression of L-selectin ligand (MECA-79) was similar in both groups; (C) The expression of E-cadherin was lower in the PCOS group in the proliferative phase ($p < 0.05$); (D) The expression of ICAM-1 was lower in the PCOS group in the proliferative phase ($p < 0.05$). Photomicrographs of endometrial samples following immunohistochemistry. (E) $\alpha v\beta 3$ Integrin – control group in the proliferative phase; (F) $\alpha v\beta 3$ Integrin – the PCOS group in the proliferative phase; (G) L-selectin ligand (MECA-79) – control group in the proliferative phase; (H) L-selectin ligand (MECA-79) – the PCOS group in the proliferative phase; (I) E-cadherin – control group in the proliferative phase; (J) E-cadherin – the PCOS group in the proliferative phase; (K) ICAM-1 – control group in the proliferative phase; (L) ICAM-1 – the PCOS group in the proliferative phase. The numbers represent the respective negative controls (nonspecific goat antibodies) of immunohistochemical reactions: (1) $\alpha v\beta 3$ Integrin; (2) L-selectin ligand (MECA-79); (3) E-cadherin; (4) ICAM-1. Bar = 20 μm ; original magnification 400 X.

Fig. 2. Graphic representation of the total index: (A) The expression of $\alpha v\beta 3$ Integrin was higher in the control group in the secretory phase ($p < 0.01$); (B) The expression of L-selectin ligand (MECA-79) was lower in the PCOS group in the secretory phase ($p < 0.1$); (C) The expression of E-cadherin was higher in the PCOS group in the secretory phase ($p < 0.05$); (D) The expression of ICAM-1 was similar in both groups ($p = 0.55$). Photomicrographs of endometrial samples following immunohistochemistry. (E) $\alpha v\beta 3$ Integrin – control group in the secretory phase; (F) $\alpha v\beta 3$ Integrin – the PCOS group in the secretory phase; (G) L-selectin ligand (MECA-79) – control group in the secretory phase; (H) L-selectin ligand (MECA-79) – the PCOS group in the secretory phase; (I) E-cadherin – control group in the secretory phase; (J) E-cadherin – the PCOS group in the secretory phase; (K) ICAM-1 – control group in the secretory phase; (L) ICAM-1 – the PCOS group in the secretory phase. The numbers represent the respective negative controls (nonspecific

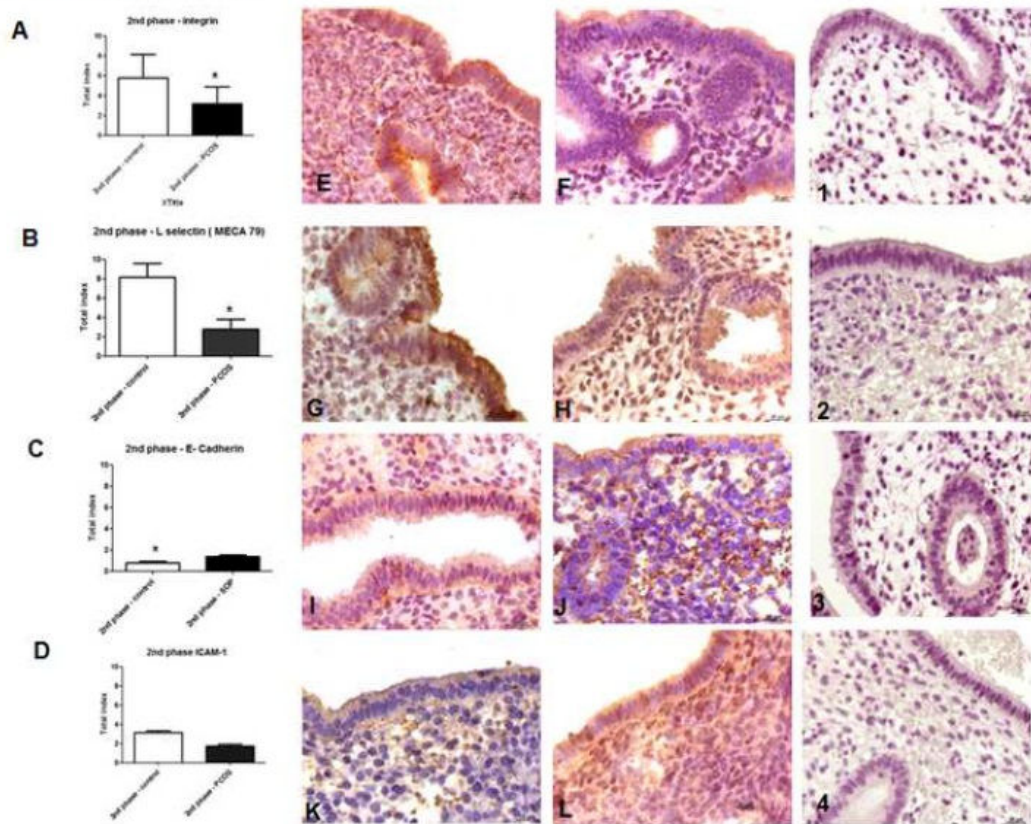
goat antibodies) of immunohistochemical reactions: (1) Alfa-v Beta 3 Integrin; (2) L-selectin ligand (MECA-79); (3) E-Cadherin ; (4) ICAM-1. Bar = 20 μ m; original magnification 400 X.

Figure
[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Table

Table 1 – Clinical and ultrasound characteristics of the investigated women in the control and PCOS groups (mean and standard deviation).

	Control group (n=35)	PCOS (n=34)	p value
Age (years)*	30.81 ± 2.56	28.03 ± 3.19	0.31
Menarche (years)*	12.03 ± 0.98	11.18 ± 0.83	0.21
Parity **	2.57 ± 0.69	-	-
Nº of menstrual cycles per year (no./year)*	12.7 ± 0.55	4.23 ± 1.34	<0.01
Ferriman & Galley score*(≥8-Hirsutism)	2.06 ± 1.62	9.35 ± 1.22	<0.01
Body mass Index (Kg/m²)*	25.49 ± 2.45	30.01 ± 2.78	<0.05
Waist circumference (cm)***	80.96 ± 6.29	88.05 ± 7.91	<0.05
Hip (cm)***	112.06 ± 11.97	100.05 ± 8.07	0.41
Ultrasound (follicular phase)			
R ovary volume (cm3)***	5.98 ± 1.18	11.53 ± 2.77	<0.01
L ovary volume (cm3)***	6.01 ± 1.08	11.96 ± 2.96	<0.01

* Unpaired Student's t-test, ** Statistical testing was not performed due to the absence of pregnancies in the PCOS group; *** Mann-Whitney test.

Table 2 – Mean and standard error of the histomorphometric findings and Immunostaining of $\alpha v\beta 3$ Integrin, L-selectin ligand (MECA-79), E-cadherin, and ICAM-1 in the endometrial luminal epithelium of the participants in the control group and the women with PCOS before and during the use of micronized progesterone.

	1 st Phase (Proliferative)			2 nd Phase (Secretory)		
	Control G	PCOS G	p	Control G	PCOS G (During the use of P)	P
Luminal epithelium thickness (μm^2)	20.29 \pm 0.04	26.81 \pm 0.03*	<0.01	22.01 \pm 0.17	27.37 \pm 0.33*	<0.01
Glands (%)	12.40 \pm 0.54	13.30 \pm 0.81	0.36	39.33 \pm 1.36	22.60 \pm 1.38*	<0.01
Gland/stroma ratio (%)	0.14 \pm 0.16	0.15 \pm 0.17	0.96	0.64 \pm 0.16	0.29 \pm 0.17*	<0.01
Number vessels/field	1.80 \pm 0.07	2.12 \pm 0.11 *	<0.01	2.0 \pm 0.11	2.17 \pm 0.07	0.21
$\alpha v\beta 3$ Integrin	0.50 \pm 0.15	0.70 \pm 0.21	0.44	5.80 \pm 0.74	3.20 \pm 0.53*	<0.01
L-selectin ligand (MECA-79)	0.58 \pm 0.13	0.50 \pm 0.14	0.68	8.18 \pm 0.42	2.80 \pm 0.32*	<0.01
E-cadherin	3.60 \pm 0.16	2.80 \pm 0.24*	<0.05	0.80 \pm 0.13	1.40 \pm 0.16*	<0.05
ICAM-1	2.71 \pm 0.12	1.57 \pm 0.13*	<0.05	3.14 \pm 0.17	1.71 \pm 0.19	0.55
P=progesterone / * Unpaired Student's t-test						

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é o distúrbio endócrino mais frequente em mulheres na idade reprodutiva e o principal fator de infertilidade por anovulação (BART et al., 2012). Sua etiologia ainda é obscura e há controvérsias sobre suas várias expressões fenotípicas, que com frequência inclui espaniomenorréia ou amenorréia (oligo-ovulação), hiperandrogenismo e imagens ultrassonográficas com ovários policísticos (AZZIZ et al., 2006).

As mulheres com SOP também podem ter resistência à insulina, intolerância à glicose, concentração sérica de LH elevada e deficiência parcial de FSH. Deve-se ainda salientar que a maior parte das mulheres com essa síndrome pode ter sobrepeso ou ser obesa, ter alterações metabólicas associadas, como dislipidemias e, ainda, podem chegar ao consultório médico se queixando de infertilidade (MACIEL et al., 2004; GIUDICE, 2006; QUEZADA et al., 2006; QIAO et. 2008; BART et al, 2012).

Apesar de todo o desenvolvimento das técnicas de reprodução humana, as taxas de gravidez ainda são baixas (CAKMAK e TAYLOR, 2011). Portanto, questiona-se qual seria o fator que determinaria essas taxas. Em nosso trabalho, estamos avaliando se o endométrio poderia ser um dos limitantes para o processo de implantação embrionária e desenvolvimento da gestação, mesmo que este seja previamente preparado com ministração de progesterona natural ou progestagênio. Assim, nossos dados sugerem que o emprego de progesterona micronizada em doses convencionais não seria o suficiente para restaurar a morfologia normal do endométrio ou normalizar a expressão de proteínas relacionadas com a adesão do embrião ao tecido endometrial. Este dado pode justificar, em parte, a dificuldade da adesão embrionária ao endométrio. Nesse sentido, outros investigadores também

estão analisando a disfunção endometrial em mulheres com SOP para desenvolver novas terapias que proporcionem um endométrio mais adequado para implantação. (LAI et al., 2005; QUEZADA et al., 2006; FOULK et al., 2007; KILIC et al., 2008; MARGARIT et al., 2010).

Nossos dados evidenciaram alguns aspectos histomorfométricos do endométrio das pacientes com SOP que eram diferentes do grupo controle. Apesar do estroma e a quantidade de glândulas serem semelhantes na fase proliferativa, a espessura do epitélio luminal e o número de vasos sanguíneos eram superiores ao controle. Isso poderia ser explicado porque as mulheres com SOP, por serem anovulatórias ou oligo-ovulatórias, teriam ação do estrogênio maior sem as mudanças sequenciais na expressão de genes e processos bioquímicos associados do ciclo ovulatório (TALBI et al., 2006). Isso resultaria em proliferação celular endometrial mais acentuada com deficiência na diferenciação tecidual, mesmo com tratamento prévio de progesterona micronizada.

Salienta-se, ainda, que o crescimento e a diferenciação do endométrio na SOP são influenciados pelos androgênios, insulina e fatores de crescimentos, que estão aumentados nessas mulheres (APPARAO et al., 2002; GIUDICE, 2006; CAKMAK e TAYLOR, 2011). Sem o efeito regulatório da progesterona, a ação mitogênica estrínica junto com as substâncias referidas anteriormente, poderiam levar ao crescimento endometrial desordenado, levando a hiperplasia, aumento do risco de câncer endometrial e a ocorrência de sangramento uterino mais volumoso (ELLIOT et al., 2001; CHEUNG, 2001; GIUDICE, 2006). Pode-se discutir sobre a ação androgênica no endométrio por sua ação antagonista ao estrogênio. Contudo,

deve-se citar que há presença de aromatase endometrial (MAIA et al., 2009) o que poderia explicar em parte nossos achados.

Após o uso da progesterona micronizada, o endométrio das mulheres do grupo SOP apresentou mudanças histológicas compatíveis com a fase secretora e a espessura endometrial foi maior e o número de glândulas endometriais menores que as mulheres do grupo controle. Tem sido demonstrado que o endométrio de mulheres com SOP é frequentemente disfuncional pelos estrogênios elevados (sem a oposição da progesterona), hiperinsulinemia diminuição da IGFBP-I, resultando em aumento do IGF-I livre na circulação (GIUDICE, 2006), mantendo-o fora de fase, segundo os critérios de NOYES et al.(1975). Contudo, acreditávamos que o emprego da progesterona (200mg/dia) por 10 dias seria o suficiente para a transformação adequada do endométrio. Nossos dados histológicos sugerem que não seriam suficientes para mudar as alterações endometriais existentes, principalmente no epitélio superior. Adicionalmente, estas mulheres também teriam um déficit parcial do número de glândulas endometriais. Isto poderia reforçar que há mudanças histológicas importantes que não reverterem com a ministração de progesterona.

Tem sido descrito que a ação da progesterona inadequada poderia ser relacionada como causa de infertilidade. Estes autores sugerem que o problema central da falha deste hormônio seria o próprio receptor (LAVEN et al., 2001; MUSSO et al., 2004; SAVARIS et al., 2011). Contudo, em nossos dados, seria importante ressaltar que há outros distúrbios endócrinos relacionados com a SOP, como incremento da ação de fatores de crescimento (GHOSH et al., 2011) que podem interferir com a própria ação da progesterona no endométrio (LI et al., 2009).

Talvez, para anular esse efeito, a dose deva ser maior ou o tratamento por um tempo mais prolongado. A progesterona em animais pode diminuir a ação dos fatores de crescimento no endométrio (MCCARTHY et al., 2012).

Os dados da literatura não estão claros se as mulheres com SOP teriam um endometrio realmente disfuncional pela anovulação e com níveis reduzidos de progesterona. Alguns estudos têm indicado que o endométrio estaria inadequado para implantação na SOP, incluindo distúrbios na proliferação e na diferenciação celular, conjuntamente com resposta celular inadequada, independente da anovulação. Contudo, outros autores não acreditam que as mulheres com SOP tenham alterações significantes na receptividade endometrial (QIAO et al., 2008; MALIQUEO et al., 2003; HEIJNEN et al., 2006). Todavia, nossos dados sugerem que há necessidade de mais atenção para a transformação endometrial com progesterona em mulheres com SOP. Talvez outros fatores devam ser corrigidos para maior sucesso nos programas de reprodução assistida.

Durante a fase secretora, o endométrio completa sua diferenciação para a implantação e o uso de técnicas moleculares e imunoistoquímicas têm conseguido identificar vários biomarcadores na superfície do epitélio luminal do endométrio humano que podem participar no processo de implantação do embrião (LESSEY et al., 2002; LAI et al., 2005). Dentre eles citamos a αv - $\beta 3$ -Integrina (LESSEY et al., 1992; REDDY e MANGALE, 2003; DUQUESNAY et al., 2009), a L-Selectina (LAI et al., 2005; FOULK et al., 2007; MARGARIT et al., 2010; LESSEY, 2011; WANG et al., 2011) E-Caderina e o ICAM-1 (ACHACHE e REVEL, 2006). Esses marcadores bioquímicos, quando alterados, poderiam explicar alguns casos de infertilidade sem causa aparente, endometriose, SOP e abortos recorrentes (LAI et al., 2005;

LESSEY, 2011). Por esta razão, escolhemos para estudar a receptividade endometrial após tratamento com progesterona micronizada.

A progesterona é conhecida como sendo indispensável para a diferenciação das células estromais endometriais em humanos, processo crítico à implantação e à placentação (GIUDICE, 2006). Na nossa amostra, mostramos que mesmo com o tratamento de progesterona micronizada na SOP, há alterações de moléculas de adesão no endométrio humano ao embrião. Outros estudos mostraram que estas substâncias podem justificar a infertilidade em alguns casos (LAI et al., 2005; LESSEY, 2011).

A avaliação da fase secretora do endométrio em mulheres anovulatórias é difícil de estudar sem usar medicamentos, como citrato de clomifeno (SAVARIS et al., 2011), gonadotrofinas ou análogos do GnRH (LAI et al., 2005). Uma crítica a estes trabalhos é que essas substâncias também poderiam modificar a receptividade do endométrio (LAI et al., 2005). Assim, procuramos um modelo que pudesse mimetizar o que ocorreria no endométrio quando fosse repostado o que está muito deficiente, que é a progesterona. Portanto, a progesterona oral micronizada (200mg/dia) por 10 dias foi empregada em mulheres com SOP para transformar esse endométrio proliferativo em secretor e saber se isto seria suficiente para termos um endométrio próximo do normal durante a “janela de implantação embrionária” (fase secretora média). Contudo, nossos dados mostraram que o endométrio se aproxima do aspecto do controle, mas apresenta tanto alterações da histomorfologia quanto de proteínas ligadas com a adesão embrionária.

Um dos biomarcadores endometriais bem caracterizados relacionados à infertilidade é a $\alpha\beta 3$ -Integrina (LESSEY, 2011) que pertence à classe das integrinas

que são moléculas de adesão celular, consistidas por glicoproteínas heterodiméricas. Estas substâncias são ancoradas na membrana plasmática e servem para múltiplas funções dentro das células endometriais, inclusive acredita-se que participe da implantação embrionária (DONAGHAY e LESSEY, 2007; LESSEY, 2011; DUQUESNAY et al., 2009). Salienta-se que estas integrinas aparecem no ápice da superfície luminal em forma de grânulos secretórios subnucleares e glandulares, coincidindo com a abertura da “janela de implantação” (LESSEY et al, 1992; LESSEY, 2011) e sua expressão persiste até a gravidez com expansão para a decidua. No endométrio de mulheres com SOP foi encontrado diminuição da $\alpha\beta3$ -Integrinas na “janela de implantação” quando comparada ao controle (LESSEY, 2011; CERMIK et al., 2003). Entretanto, a literatura é controversa, alguns estudos mostram resultados diferentes com a expressão da $\alpha\beta3$ -Integrina durante a fase lútea (LESSEY e ARNOLD, 1998; LACIN et al., 2001; THOMAS et al., 2003; KILIC et al., 2008).

A $\alpha\beta3$ -Integrina é vista como preditora de sucesso da FIV, mas somente um número limitado de estudos foi publicado (THOMAS et al., 2003; REVEL et al., 2005; CASALS et al., 2010; LESSEY, 2011;). Alguns estudos têm demonstrado variações dinâmicas e distribuições cíclicas da $\alpha\beta3$ -Integrina no endométrio, e essas mudanças podem ser induzidas como resultado de tratamentos com gonadotrofinas e clomifeno (QUEZADA et al., 2006), enquanto outros examinando as células endometriais *in vitro*, sugerem que as integrinas podem ser reguladas por citocinas, fatores de crescimento e hormonais (GROSSKINSKY et al., 1996; SILLEM et al., 1997). Portanto, outros fatores além da progesterona estão influenciando a expressão desta integrina em nossa amostra. Poderia ser o IGF-1, que alguns

investigadores sugerem que estão aumentados na SOP, bem como alterações como excesso de androgênios e/ou insulina (APPARAO et al., 2002; GIUDICE, 2006).

LESSEY e ARNOLD (1998) notaram que a $\alpha\beta 3$ -Integrina aumenta com a administração exógena de estrogênio e progesterona durante a “janela de implantação”. Por outro lado, foi publicado que a expressão da $\alpha\beta 3$ -Integrina diminui nas pacientes em tratamento com indutores da ovulação e conjuntamente há disruptura da harmonia da estrutura glândula-estroma (aumento excessivo do estroma) pelos níveis supra fisiológicos do estrogênio (CREUS et al., 1998; THOMAS et al., 2003; MYERS et al., 2004). Contudo, LACIN et al (2001) não encontraram mudanças nas integrinas quando administraram citrato de clomifeno, contraceptivo hormonal, estrogênio e progesterona às pacientes com infertilidade sem causa aparente. Salienta-se que a grande crítica a este trabalho seria se algumas pacientes sem causa aparente não teria endometriose ou outra alteração que pudesse ter comportamento diferente das integrinas.

Outro biomarcador luminal do endométrio estudado é o ligante da L-selectina, chamado MECA-79. (VAN DER STOLPE e VAN DER SAAG, 1996; GENBACEV et al., 2003; LAI et al., 2005; FOULK et al., 2007; MARGARIT et al., 2010; WANG et al., 2011). GENBACEV et al. (2003) mostraram que a L-selectina tem papel crucial durante a fase inicial da implantação do blastocisto. O blastocisto expressa a L-selectina e usa esta molécula para mediar sua ligação ao epitélio superficial do endométrio pelo seu ligante, o carboidrato MECA-79 durante a fase lútea (FOULK et al., 2007).

Os achados do nosso grupo controle refletem os dados já referidos por outros autores, ou seja, que o MECA-79 tem baixa expressão na fase proliferativa e alta na

fase secretora (LAI et al., 2005; MARGARIT et al., 2010). Além disso, FOULK et al (2007) encontraram redução da expressão do MECA-79 em pacientes com repetição das falhas da implantação. Estes dados sugerem que esta substância poderia estar relacionada com distúrbios da receptividade endometrial. Os nossos dados mostraram que a MECA-79 se eleva com a ministração de progesterona nas mulheres com SOP, mas o valor é inferior ao controle, ou seja, a administração de progesterona isolada não consegue reverter a deficiência desse biomarcador da receptividade endometrial durante a “janela de implantação”. Possivelmente, outros fatores também estão envolvidos na expressão desta substância, como ocorre com as integrinas.

A E-caderina é outra molécula de adesão importante no mecanismo de adesão celular, sendo dependente de cálcio. Sua perda é necessária para que ocorra a penetração e invasão do trofoblasto no endométrio (REDDY e MANGALE, 2003), pois, esta substância é importante para manter as células coaptadas (ACHACHE e REVEL, 2006). Todavia, o papel real da E-caderina na implantação do embrião humano não é totalmente conhecido. Foi descrito que a superexpressão dessa substância poderia interferir na invasão do embrião (ACHACHE e REVEL, 2006). Acredita-se que a calcitonina endometrial, estimulada pela progesterona, suprime a E-caderina na fase secretora do ciclo menstrual (APLIN, 1996; KUMAR et al., 1998). Contudo, a progesterona micronizada não foi suficiente para reduzir essa substância, como ocorreu com as mulheres do grupo controle durante a “janela de implantação”.

É possível que essa molécula tenha uma dupla função: na fase proliferativa sua expressão está aumentada, mas na segunda fase (janela de implantação) está

diminuída para a dissociação entre as células e invasão do blastocisto (ACHACHE e REVEL, 2006). Esta substância foi pouco estudada em mulheres com SOP e nosso trabalho mostra que também poderia ser outro fator a dificultar a gravidez em mulheres com anovulação crônica. No nosso estudo foi encontrada uma redução da expressão da E-caderina em relação ao controle. Porém, após a ministração de progesterona, a redução foi bem menor, havendo uma inversão na segunda fase com mais E-caderina na SOP do que no controle. Uma explicação poderia ser que a dose e o tempo de uso da progesterona exógena utilizada não foram suficientes para estimular a calcitonina endometrial e diminuir a E-caderina (APLIN, 1997; APLIN, 2008). Outra hipótese seria também a presença de outros fatores influenciando, como ocorreu com as integrinas e o ligante MECA-79 da L-selectinas.

A ICAM-1 (ou CD54), que pertence à superfamília das imunoglobulinas, é uma molécula de adesão celular que media a interação da migração transendotelial de leucócitos e várias outras funções imunológicas (VAN DER STOLPE e VAN DER SAAG, 1996). Está imunolocalizada na superfície apical da célula epitelial endometrial (THOMSON et al., 1999). Evidências sugerem que o estado de inflamação crônica de disfunção endotelial está envolvido na patogênese da SOP e suas características associadas, como a resistência a insulina, dislipidemia e aterosclerose (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 1999). As moléculas de adesão celular são importantes biomarcadores de disfunção endotelial e os seus níveis plasmáticos aumentam em resposta a inflamação crônica (BLANKENBERG et al., 2003). Paradoxalmente, não encontramos na SOP elevação superior desta substância, nem na fase proliferativa nem durante a ministração de progesterona, quando comparadas com o grupo controle.

Deve-se ainda citar que a ICAM-1 aumenta em mulheres com diabetes mellitus (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 1999; LAVEN et al., 2001, MUSSO et al., 2004; GIUDICE, 2006;). Embora a ICAM-1 não tenha sido mostrada ser essencial para a interação do blastocisto com o endométrio, esta substância poderia participar indiretamente por interagir com o sistema imune. É bem estabelecido que o endométrio sob condições normais contém grande quantidade de leucócitos, incluindo macrófagos, linfócitos T e granulócitos (ACHACHE E REVEL, 2006), que estão presentes em muitos mecanismos fisiológicos como a decidualização (KING, 2000), menstruação (SALAMONSEN et al., 2000) e parturição (YELLON et al., 2003). Estas substâncias também poderiam interferir com a implantação. Outro estudo também não encontrou modificações importantes com a ICAM-1. De fato, GAFFURI et al. (2000) encontraram igual expressão da ICAM-1 nas células endometriais na fase lútea de pacientes inférteis, com e sem abortos recorrentes, embora houvesse uma pequena diminuição em relação ao grupo controle. Isto corrobora os nossos achados de diminuição da expressão dessa proteína, principalmente na fase proliferativa em relação ao controle. Ressalte-se que os estudos existentes na literatura são escassos e precisa-se de mais evidências comprobatórias de que a ICAM-1 não teria um papel relevante no endométrio para a implantação do blastocisto.

Os dados do presente estudo nos permite concluir que:

1. Após a análise histomorfométrica notamos que o epitélio luminal (ou superficial) e o número de vasos sanguíneos do endométrio de mulheres com SOP eram superiores ao das mulheres do grupo controle durante a fase proliferativa. Durante o uso da progesterona, o epitélio luminal do grupo SOP continuava ainda mais espesso do que o controle, mas o número relativo de glândulas endometriais era menor do que o controle;
2. A imunoexpressão da $\alpha\beta 3$ -Integrina no compartimento epitelial luminal e glandular do endométrio das mulheres com SOP foi igual ao grupo controle na fase proliferativa. Durante o uso da progesterona, houve diminuição da imunoexpressão dessa substância no endométrio das mulheres com SOP em relação ao grupo controle;
3. A imunoexpressão do ligante da L-selectina, o MECA-79, no compartimento epitelial e glandular do endométrio das mulheres com SOP, apresentou igual comportamento na fase proliferativa. Durante o uso da progesterona, houve redução deste ligante no endométrio das mulheres com SOP quando comparadas ao grupo controle;
4. A imunoexpressão da E-caderina no compartimento epitelial luminal e glandular do endométrio das mulheres com SOP se revelou menor do que no grupo controle na fase proliferativa. Durante o uso da progesterona, houve o inverso, incremento da imunexpressão dessa substância em relação ao grupo controle;
5. A imunoexpressão da ICAM-1 no endométrio de mulheres com SOP mostrou diferenças na fase proliferativa, mas não durante o uso da progesterona quando

comparada às mulheres do grupo controle.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHACHE H, REVEL A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum Reprod Update. 2006;12:731-46.

ALON R, FEIGELSON S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. Semin Immunol. 2002;14:93-104.

APLIN JD. The cell biology of human implantation. Placenta. 1996;17:269-275.

APLIN JD. Adesion molecules in implantation. Rev Reprod. 1997;2:84-93.

APLIN JD. The cell biological basis of human implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2000;14:757-64.

APLIN JD, SINGER H. Bioinformatics and transcriptomics studies of implantation. Ann N Y Acad Sci. 2008;1127:16-20.

APPARAO KB, LOVELY LP, GUI Y, LININGER RA, LESSEY BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. Biol Reprod. 2002;66:297-304.

AZZIZ R, CARMINA E, DEWAILLY D, DIAMANTI-KANDARAKIS E, ESCOBAR-MORREALE HF, FUTTERWEIT W, JANSSEN OE, LEGRO RS, NORMAN RJ, TAYLOR AE, WITCHEL SF. Androgen Excess Society. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly

hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91:4237-45.

AZZIZ R, CARMINA E, DEWAILLY D, DIAMANTI-KANDARAKIS E, ESCOBAR-MORREALE HF, FUTTERWEIT W, JANSSEN OE, LEGRO RS, NORMAN RJ, TAYLOR AE, WITCHEL SF; TASK FORCE ON THE PHENOTYPE OF THE POLYCYSTIC OVARY SYNDROME OF THE ANDROGEN EXCESS AND PCOS SOCIETY. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. Fertil Steril. 2009;91:456-88.

BARACAT EC, SOARES JR JM. Ovários policísticos, resistência insulínica e síndrome metabólica. Rev Bras Ginec Obstet. 2007;29:117-9.

BART CJ, FAUSER BC, TARLATZIS BC, REBAR RW, LEGRO RS, BALEN AH, LOBO R, CARMINA E, CHANG J, YILDIZ BO, LAVEN JS, BOIVIN J, PETRAGLIA F, WIJEYERATNE CN, NORMAN RJ, DUNAIF A, FRANKS S, WILD RA, DUMESIC D, BARNHART K. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. Fertil Steril. 2012;97:28-63.

BATISTA JG, SOARES-JR JM, MAGANHIN CC, SIMÕES RS, TOMAZ G, BARACAT EC. Assessing the benefits of rosiglitazone in women with polycystic ovary syndrome through its effects on insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor-binding protein-3 and insulin resistance: a pilot study. Clinics (Sao Paulo). 2012;67:283-7.

BELLVER J, MARTÍNEZ-CONEJERO JA, LABARTA E, ALAMÁ P, MELO MA, REMOHÍ J, PELLICER A, HORCAJADAS JA. Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95:2335-41.

BERGERON C, FERENCZY A, SHYAMALA G. Distribution of estrogen receptors in various cell types of normal, hyperplastic, and neoplastic human endometrial tissues. *Lab Invest*. 1988;58:338-45.

BLANKENBERG S, BARBAUX S, TIRET L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003;70:191-203.

CAKMAK H, TAYLOR HS. Human implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update* 2011;17:242-53.

CASALS G, ORDI J, CREUS M, FÁBREGUES F, CARMONA F, CASAMITJANA R, BALASCH J. Osteopontin and alphavbeta3 integrin as markers of endometrial receptivity: the effect of different hormone therapies *Reprod Biomed Online*. 2010;21:349-59.

CERMIK D, SELAM B, TAYLOR HS. Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:238-43.

CHEANG KI, BAILLARGEON JP, ESSAH PA, OSTLUND RE JR, APRIDONIZE T, ISLAM L, NESTLER JE. Insulin-stimulated release of D-chiro-inositol-containing

inositolphosphoglycan mediator correlates with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2008;57:1390-7.

CHEUNG AP. Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol*. 2001;98 :325-31.

CREUS M, BALASCH J, ORDI J, FÁBREGUES F, CASAMITJANA R, QUINTO L, COUTIFARIS C, VANRELL JA. Integrin expression in normal and out-of-phase endometria. *Hum Reprod*. 1998;13:3460-8.

DAFTARY GS, KAYISLI U, SELI E, BUKULMEZ O, ARICI A, TAYLOR HS. Salpingectomy increases peri-implantation endometrial HOXA10 expression in women with hydrosalpinx. *Fertil Steril*. 2007;87:367-72.

DEFRÈRE S, VAN LANGENDONCKT A, MOULIN P, BEFAHY P, GONZALEZ D, MARTINEZ-MADRID B, DOLMANS MM, DONNEZ J. Human endometrial epithelial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *Am J Reprod Immunol*. 2005;54:5-12.

DIAMANTI-KANDARAKIS E, KOULI CR, BERGIELE AT, FILANDRA FA, TSIANATELI TC, SPINA GG, ZAPANTI ED, BARTZIS MI. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek Island of Lesbos: a hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4006-4011.

DIAMANTI-KANDARAKIS E, DUNAIF A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev.* 2012;33:981-1030.

DONAGHAY M, LESSEY BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med.* 2007;25:461-75.

DUQUESNAY R, WRIGHT C, AZIZ AA, STAMP GW, TREW GH, MARGARA RA, WHITE JO. Infertile women with isolated polycystic ovaries are deficient in endometrial expression of osteopontin but not alphavbeta3 integrin during the implantation window. *Fertil Steril.* 2009;91:489-99.

ELLIOTT JL, HOSFORD SL, DEMOPOULOS RI, PERLOE M, SILLS ES. Endometrial adenocarcinoma and polycystic ovary syndrome: risk factors, management and prognosis. *South Med J.* 2001;94:529-31.

ENDERS A. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat.* 1967;125:1-29.

FAZLEABAS AT, KIM JJ. Development. What makes an embryo stick? *Science.* 2003;299:355-6.

FERRIMAN D, GALLWEY JD. Clinical assesement of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961;4:155-62.

FOULK R, ZDRAVKOVIC T, GENBACEV O, PRAKOBPOL O. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity J Assist Reprod Genet. 2007;24:316-21.

FUJIMOTO J, ICHIGO S, HORI M, TAMAYA T. Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. Gynecol Endocrinol. 1996;10:187-91.

GAFFURI B, AIROLDI L, DI BLASIO AM, VIGANÒ P, MIRAGOLI AM, SANTORSOLA R, VIGNALI M. Unexplained habitual abortion is associated with a reduced endometrial release of soluble intercellular adhesion molecule-1 in the luteal phase of the cycle. Eur J Endocrinol. 2000;142:477-80.

GENBACEV OD, PRAKOBPHOL A, FOULK RA, KRTOLICA AR, ILIC D, SINGER MS, YANG Z-Q, KIESSLING LL, ROSEN SD, FISHER SJ. Trophoblast L-Selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. Science 2003;299:405-8.

GERMEYER A, JAUCKUS J, ZORN M, TOTH B, CAPP E, STROWITZKI T. Metformin modulates IL-8, IL-1 β , ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells. Reprod Biomed Online. 2011;22:327-34.

GHOSH D, NAJWA AR, KHAN MA, SENGUPTA J. IGF2, IGF binding protein 1, and matrix metalloproteinases 2 and 9 in implantation-stage endometrium following immunoneutralization of vascular endothelial growth factor in the rhesus monkey. Reproduction. 2011;141:501-9.

GIORDANO MG, GIORDANO MV, GIORDANO LA, GARCIA SMA. CICLO MENSTRUAL IN: GIORDANO MG. Endocrinologia ginecológica e reprodutiva. Rio de Janeiro: Rubio. 2009;39-47.

GIUDICE LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2006;20:235-44.

GREGORY CW, WILSON EM, APPARAO KB, LININGER RA, MEYER WR, KOWALIK A, FRITZ MA, LESSEY BA. Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:2960-6.

GROSSKINSKY CM, YOWELL CW, SUN J, PARISE LV, LESSEY BA. Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells in vitro. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81:2047-54.

GUASTELLA E, LONGO RA, CARMINA E. Clinical and endocrine characteristics of the main polycystic ovary syndrome phenotypes. Fertil Steril. 2010;94:2197-201.

GUZELOGLU-KAYISLI O, KAYISLI UA, TAYLOR HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. Semin Reprod Med. 2009;27:62-79.

HEIJNEN EM, EIJKEMANS MJ, HUGHES EG, LAVEN JS, MACKLON NS, FAUSER BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update. 2006;12:13-21.

HEMLER ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. Annu Rev Immunol. 1990;8:365-400.

HYNES RO Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell. 1992;69:11-25.

IUORNO MJ, JAKUBOWICZ DJ, BAILLARGEON JP, DILLON P, GUNN RD, ALLAN G, NESTLER JE. Effects of d-chiro-inositol in lean women with the polycystic ovary syndrome. Endocr Pract. 2002 ;8:417-23.

JABBOUR HN, KELLY RW, FRASER HM, CRITCHLEY HOD, Endocrine regulation of menstruation. Endocr Rev.2006;27:17-46.

KATSIKIS I, KARKANAKI A, MISICHRONIS G, DELKOS D, KANDARAKI EA, PANIDIS D. Phenotypic expression, body mass index and insulin resistance in relation to LH levels in women with polycystic ovary syndrome. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2011;156:181-5.

KILIC S, HATIPOGLU T, ERDOGAN D, ELMAS C, YUKSEL B, TASDEMIR N, YILMAZ N, BATIOGLU S. Impact of high levels of progesterone on alpha(1)-integrin distribution in the endometrium of patients with unexplained infertility. Acta Histochem. 2008;110:363-70.

KING A. Uterine leukocytes and decidualization. Hum Reprod Update. 2000;6:28-36.

KUMAR S, ZHU LJ, POLIHRONIS M, CAMERON ST, BAIRD DT, SCHATZ F, DUA A, YING YK, BAGCHI MK, BAGCHI IC. Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83:4443-50.

LACIN S, VATANSEVER S, KUSCU NK, KOYUNCU F, OZBILGIN K, CEYLAN E. Clomiphene citrate does not affect secretion $\alpha 3$, αv and β integrin molecules during the implantation window in patients with unexplained infertility. Hum Reprod 2001;16:2305-9.

LAI TH, SHIH IEM, VLAHOS N, HO CL, WALLACH E, ZHAO Y. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. Fertil Steril. 2005;83:1297-302.

LAVEN JS, IMANI B, EIJKEMANS MJ, DE JONG FH, FAUSER BC. Absent biologically relevant associations between serum inhibin concentrations and characteristics of polycystic ovary syndrome normogonadotrophic anovulatory infertility. Hum Reprod. 2001;16:1359-64.

LESSEY B.A.; DAMJANOVICH L.; COUTIFARIS C.; CASTELBAUM A.; ALBELDA S.M.; BUCK C.A. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. J Clin Invest 1992;90:188-195.

LESSEY BA, ARNOLD JT. Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity. J Reprod Immunol. 1998;39:105-16.

LESSEY BA, CASTELBAUM AJ, WOLF L, GREENE W, PAULSON M, MEYER WR, FRITZ MA. Use of integrins to date the endometrium. Fertil Steril. 2000;73:779-87.

LESSEY BA. Adhesion molecules and implantation. J Reprod Immunol. 2002;55:101-12.

LESSEY BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. Steroids 2003;68:809-15.

LESSEY BA. Assessment of endometrial receptivity. Fertil Steril. 2011;96:522-9.

LI Q, WANG J, ARMANT DR, BAGCHI MK, BAGCHI IC. Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. J Biol Chem. 2002;277:46447-55.

LI SW, LI L, MA Y, CAO ZY, PENG ZL, HAN ZY. The effects of progesterone and insulin-like growth factor (IGF- I and IGF-II) on proliferation in human decidual stromal cells of early pregnancy in vitro. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2009;40:442-4.

MCCARTHY SD, ROCHE JF, FORDE N. Temporal changes in endometrial gene expression and protein localization of members of the IGF family in cattle: effects of progesterone and pregnancy. *Physiol Genomics*. 2012;44:130-40.

MOTTA AB. Report of the international symposium: polycystic ovary syndrome: first Latin-American consensus. *Int J ClinPract*. 2010;64:544-57.

MURRAY MJ, MEYER WR, ZAINO RJ, LESSEY BA, NOVOTNY DB, IRELAND K, ZENG D, FRITZ MA A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril*. 2004;81:1333-43.

MUSSO C, COCHRAN E, MORAN SA, SKARULIS MC, ORAL EA, TAYLOR S, GORDEN P. Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): a 30-year prospective. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83:209-22.

MYERS ER, SILVA S, BARNHART K, GROBEN PA, RICHARDSON MS, ROBBOY SJ, LEPPERT P, COUTIFARIS C; NICHD NATIONAL COOPERATIVE REPRODUCTIVE MEDICINE NETWORK. Interobserver and intraobserver variability in the histological dating of the endometrium in fertile and infertile women. *Fertil Steril*. 2004;82:1278-82.

MACIEL GA, SOARES JÚNIOR JM, ALVES DA MOTTA EL, ABI HAIDAR M, DE LIMA GR, BARACAT EC. Nonobese women with polycystic ovary syndrome

respond better than obese women to treatment with metformin. *Fertil Steril*. 2004;81:355-60.

MACLAUGHLAN SD, PALOMINO WA, MO B, LEWIS TD, LININGER RA, LESSEY BA. Endometrial expression of Cyr61: a marker of estrogenic activity in normal and abnormal endometrium. *Obstet Gynecol*. 2007;110:146-54.

MAIA H JR, CASOY J, VALENTE FILHO J. Is aromatase expression in the endometrium the cause of endometriosis and related infertility? *Gynecol Endocrinol*. 2009;25:253-7.

MALIQUEO M, CLEMENTI M, GABLER F, JOHNSON MC, PALOMINO A, SIR-PETERMANN T, VEGA M. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2003;80:812-9.

MARCONDES JA, HAYASHIDA SA, BARCELLOS CR, ROCHA MP, MACIEL GA, BARACAT EC. Metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome: prevalence, characteristics and predictors. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51:972-9.

MARGARIT L, TAYLOR A, ROBERTS MH, HOPKINS L, DAVIES C, BRENTON AG. MUC1 as a discriminator between endometrium from fertile and infertile patients with PCOS and endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:5320-9.

NIKAS G, AGHAJANOVA L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reprod Biomed Online*. 2002;4:18-23.

NOYES RW, HERTIG AT, ROCK J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975;122:262-263.

PANZAN MQ, MATTAR R, MAGANHIN CC, SIMÕES RD, ROSSI AG, DA MOTTA EL, BARACAT EC, SOARES-JR JM. Evaluation of FAS and caspase-3 in the endometrial tissue of patients with idiopathic infertility and recurrent pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012 (*in press*)

PONCELET C, LEBLANC M, WALKER-COMBROUZE F, SORIANO D, FELDMANN G, MADELENAT P, SCOAZEC JY, DARAÏ E. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002;81:195-203.

PSYCHOYOS A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm*. 1973;31:205-25.

QIAO J, WANG L, LI R, ZHANG X. Microarray evaluation of endometrial receptivity in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:425-35.

QUEZADA S, AVELLAIRA C, JOHNSON MC, GABLER F, FUENTES A, VEGA M. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with

uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006;85:1017-26.

RASHID NA, LALITKUMAR S, LALITKUMAR PG, GEMZELL-DANIELSSON K. Endometrial receptivity and human embryo implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2011;66:23-30.

REDDY KV, MANGALE SS. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function *Tissue Cell*. 2003;35:260-73.

REVEL A, HAIMOV-KOCHMAN R, PORAT A, LEWIN A, SIMON A, LAUFER N, GINO H, MEIROW D. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection success rates with cryopreserved sperm from patients with malignant disease *Fertil Steril*. 2005;84:118-22.

RIETHMACHER D, BRINKMANN V, BIRCHMEIER C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:855-9.

SALAMONSEN LA, DIMITRIADIS E, ROBB L. Cytokines in implantation. *Semin Reprod Med*. 2000;18:299-310.

SALAMONSEN LA, NIE G, HANNAN NJ, DIMITRIADIS E. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2009. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity. *Reprod Fertil Dev*. 2009;21:923-34.

SAVARIS RF, GROLL JM, YOUNG SL, DEMAYO FJ, JEONG JW, HAMILTON AE, GIUDICE LC, LESSEY BA. Progesterone resistance in PCOS endometrium: a microarray analysis in clomiphene citrate-treated and artificial menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:1737-46.

SHARKEY AM, SMITH SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17:289-307.

SILLEM M, PRIFTI S, SCHMIDT M, RABE T, RUNNEBAUM B. Endometrial integrin expression is independent of estrogen or progestin treatment in vitro. *Fertil Steril* 1997;67:877-82.

SIMÓN C, MARTÍN JC, PELLICER A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14:815-26.

SINGH H, APLIN JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat.* 2009;215:3-13.

SMALLEY DM, LEY K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* 2005;9:255-66.

SPEROFF L, FRITZ MA. Chronic anovulation and the polycystic ovary syndrome. In: *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* Philadelphia. 2011;495-531.

STAUN-RAM E, SHALEV E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:56.

TABIBZADEH S, BABAKNIA A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod*. 1995;10:1579-602.

TALBI S, HAMILTON AE, VO KC, TULAC S, OVERGAARD MT, DOSIOU C, LE SHAY N, NEZHAT CN, KEMPSON R, LESSEY BA, NAYAK NR, GIUDICE LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*. 2006;147:1097-121.

THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOPGROUP. REVISED 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19:41–7.

THOMAS K, THOMSON A, WOOD S, KINGSLAND C, VINCE G, LEWIS-JONES I. Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome. *Fertil Steril*. 2003;80:502-7.

THOMSON AJ, GREER MR, YOUNG A, BOSWELL F, TELFER JF, CAMERON IT, NORMAN JE, CAMPBELL S. Expression of intercellular adhesion molecules ICAM-1 and ICAM-2 in human endometrium: regulation by interferon-gamma. *Mol Hum Reprod*. 1999;5:64-70.

TRIVAX B, AZZIZ R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. Clin Obstet Gynecol. 2007;50:168-77.

USADI RS, GROLL JM, LESSEY BA, LININGER RA, ZAINO RJ, FRITZ MA, YOUNG SL. Endometrial development and function in experimentally induced luteal phase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93:4058-64.

VAN DE STOLPE A, VANDER SAAG PT. Intercellular adhesion molecule-1. J Mol Med. 1996;74:13-33.

WANG J, ARMANT DR. Integrin-mediated adhesion and signalling during blastocyst implantation. Cells Tissues Organs. 2002;172:190-201.

WANG A, JI L, SHANG W, LI M, CHEN L, WHITE RE, HAN G. Expression of GPR30, ER α and ER β in endometrium during window of implantation in patients with polycystic ovary syndrome: a pilot study. Gynecol Endocrinol. 2011;27:251-5.

WITCHEL SF, RECABARREN SE, GONZÁLEZ F, DIAMANTI-KANDARAKIS E, CHEANG KI, DULEBA AJ, LEGRO RS, HOMBURG R, PASQUALI R, LOBO RA, ZOUBOULIS CC, KELESTIMUR F, FRUZZETTI F, FUTTERWEIT W, NORMAN RJ, ABBOTT DH. Emerging concepts about prenatal genesis, aberrant metabolism and treatment paradigms in polycystic ovary syndrome. Endocrine. 2012;42:526-34.

YELLON SM, MACKLER AM, KIRBY MA. The role of leukocyte traffic and activation in parturition. J Soc Gynecol Invest. 2003;10:323-38.

ZHAO Y, GARCIA J, KOLP L, CHEADLE C, RODRIGUEZ A, VLAHOS NF. The impact of luteal phase support on gene expression of extracellular matrix protein and adhesion molecules in the human endometrium during the window of implantation following controlled ovarian stimulation with a GnRH antagonist protocol. *Fertil Steril*. 2010;94:2264-71.

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética Institucional



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 11-06-2009 21:29:47
Página: 1/2
Id = 1119

São Paulo, 30 de Abril de 2009
CEP 0164/09

Ilmo(s). Sr(a).
Pesquisador(a) Ione Maria Ribeiro Soares Lopes
Co-Investigadores: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat ;
Disciplina/Departamento Ginecologia Endócrina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador Fapesp

CARTA DE APROVAÇÃO E PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:
'ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E GÊNICA NO ENDOMÉTRIO DE MULHERES COM SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS'

ÁREA TEMÁTICA ESPECIAL: Não há necessidade de envio à CONEP para análise

CARACTERÍSTICA DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica

RISCO PACIENTE: Risco mínimo, desconforto mínimo, envolvendo biópsia de tecidos

OBJETIVOS: Comparar a expressão de moléculas de adesão no endométrio de mulheres férteis nas fases proliferativa e janela de implantação do ciclo menstrual com o endométrio de portadoras da síndrome de ovários policísticos

RESUMO: O estudo envolverá 80 mulheres no menacme, com idade de 20 a 35 anos, atendidas no Ambulatório e no Setor de Reprodução Humana da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas da Universidade Federal do Piauí no período de março de 2009 a dezembro de 2009. Serão divididas em 2 grupos de 40 pacientes: G1- mulheres inférteis com diagnóstico de síndrome de ovários policísticos (SOP); grupo 2 (controle)- mulheres saudáveis com fator masculino de infertilidade. Todas as mulheres serão submetidas à anamnese detalhada, IMC, CA, exame físico e ginecológico, com exame citopatológico cervico-vaginal normal, ultra-sonografia pélvica transvaginal, dosagens de TSH, T4 livre, testosterona livre e total, prolactina, S-DHEA, 17-OH-P, Insulina, glicemia, TTG, B-HCG e SHBG. Serão retirados dois fragmentos endometriais na fase proliferativa, no 8º dia e 23º do ciclo menstrual, para as mulheres do grupo 2 (controle). As pacientes do grupo 1 (SOP) por serem anovulatórias, a biópsia do endométrio será realizada sem programar a época do ciclo e 15 dias após a 1ª biópsia. Parte do material será incluída na parafina para estudo morfológico e imunoistoquímico (moléculas de adesão) e outra parte será congelada no nitrogênio líquido para biologia molecular.

FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: Apesar da extensa literatura sobre as moléculas de adesão e janela de implantação, o conhecimento ainda é limitado na SOP. Este projeto visa comparar a expressão de moléculas de adesão no endométrio de mulheres férteis nas fases proliferativa e janela de implantação ciclo menstrual com o endométrio de mulheres com SOP em comparação a mulheres normais.

MATERIAL E METODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados.

TCLE: Adequado

DETALHAMENTO FINANCEIRA: FAPESP

CRONOGRAMA: 48 meses

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 05/05/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o termino do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj 14. CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539 - 7162



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 11-08-2009 21:29:47
Página: 20
de 1118

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Oemar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14, CEP 04025-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5530 - 7162

ANEXO II

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO LIVRE E ESCLARECIDO

Protocolo: **Análise Imunoistoquímica e expressão gênica de moléculas de adesão no endométrio de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos.**

Trata-se de um estudo que será desenvolvido na Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM, no Departamento de Ginecologia, setor de Endocrinologia Ginecológica e no Hospital Getúlio Vargas/Universidade Federal do Piauí – UFPI, Clínica Ginecológica, setor de Reprodução Humana, cujo objetivo é encontrar no útero alterações ainda desconhecida que podem dificultar uma gravidez em mulheres com uma doença denominada Síndrome dos Ovários Policísticos, mesmo quando tentam fertilização *in vitro* (bebê de proveta) e comparar com mulheres que são férteis (não têm problemas para ter filhos).

Nos últimos anos tem havido muitos estudos para descobrir as causas que poderiam impedir ou dificultar uma gestação. A fixação do embrião (“bebê”) no útero é o primeiro passo para que ocorra uma gravidez e para que isto aconteça é necessário que o útero esteja preparado.

O útero das mulheres que engravidam espontaneamente ou após tratamento, deve passar por modificações no seu interior que possibilite a fixação do embrião.

Os pesquisadores têm demonstrado através de estudos que existe um sistema que regula a fixação do embrião no útero, um grupo de substâncias chamadas moléculas de adesão (selectinas, caderinas, integrinas e ICAM-I), que podem estar envolvidas com o preparo do útero após ocorrer a liberação do óvulo pelos ovários (ovulação) para receber o bebezinho recém formado.

Mulheres que são portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos têm naturalmente dificuldade de engravidar porque ovulam esporadicamente, mas mesmo aquelas que fazem tratamento, os resultados não são os esperados pelos médicos, podendo ter também nos seus úteros, alterações nas moléculas de adesão.

Essas possibilidades despertam o interesse de estudar esses problemas de infertilidade. Os resultados desse estudo poderão ser importantes para que essas mulheres possam finalmente encontrar um dos motivos da dificuldade de engravidar.

Para esse estudo, teremos mulheres divididas em dois grupos. O primeiro, formado por pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos e o segundo por pacientes que não tem problema de fertilidade, mas que não engravidam porque tem suas trompas ligadas e desejam reverter o processo.

Durante o estudo, você será acompanhada cuidadosamente pela Dra. Ione Lopes, uma das médicas do estudo, que irá atendê-la em todas as ocasiões necessárias.

Antes de participar desse estudo, será solicitado o seu consentimento por escrito.

Na sua primeira consulta, será realizada uma história clínica detalhada para determinar se você apresenta os critérios necessários para o estudo:

- 1- Idade entre 20 a 35 anos;
- 2- Grupo 1 – mulheres com síndrome dos ovários policísticos, com no mínimo dois dos 3 critérios, irregularidade dos ciclos menstruais; excesso de pelos no corpo e imagem de ovários policísticos (ultrassonografia);
- 3- Grupo 2 – pacientes férteis, com trompas ligadas por cirurgia prévia, mas que desejam reverter o processo (recanalizar cirurgicamente).

Nesta consulta será realizado um exame físico, coletado material para prevenção de câncer do colo do útero, solicitado exames de sangue para o diagnóstico de doenças de causas hormonais e ultrassonografia transvaginal.

Na consulta de retorno, se os exames forem normais serão solicitados uma Histerossalpingografia (exame para avaliar a permeabilidade das trompas) para todas as pacientes dos dois Grupos e espermograma para avaliação dos maridos.

Para as mulheres do segundo grupo será solicitada, também uma ultrassonografia a cada três dias para o acompanhamento do crescimento do óvulo no ovário e verificar a ovulação.

Serão retiradas das duas amostras do interior do útero para posterior análise, a primeira no 8º dia e a segunda no 23º dia do ciclo menstrual, para as mulheres que ovularam (Grupo 2) além da dosagem sérica de Progesterona nesse mesmo dia. Nas pacientes com síndrome dos ovários policísticos, a primeira amostra será agendada para qualquer dia (Grupo 1 não ovulatórias), após o resultado do B-HCG (afastar gravidez) e a segunda amostra com 10 dias após tomar um medicamento hormonal (progesterona micronizada, 200mg, por via oral) para tornar o endométrio parecido ao das mulheres que ovulam regularmente.

Riscos e desconfortos:

- Coleta de sangue da veia periférica do antebraço, para a realização dos exames. Pode causar uma pequena dor e roxo no braço;

- Exame Histerossalpingografia, para mostrar normalidade do interior das trompas, o caminho dos espermatozóides na fecundação. Pode causar desconforto ou dor tipo cólica na passagem da substância (contraste) dentro do útero. Este exame já faz parte da investigação de todos os casos de infertilidade e é necessário para as mulheres do grupo que pretende recanalizar as trompas ligadas;

- Ultrassonografia transvaginal para acompanhar os crescimentos dos folículos dos ovários. Ocasionalmente um pequeno desconforto na colocação da sonda na vagina;

- Biópsia do endométrio- serão retiradas 2 amostras microscópicas da camada interna do útero para as análises, no 9º e 23º dia do ciclo menstrual (Grupo 2) e para as mulheres com Síndrome dos ovários policísticos, as duas coletas terão um espaço de 10 dias. Você poderá sentir cólicas durante o

procedimento e possivelmente um discretíssimo sangramento transvaginal nos próximos dois dias.

Durante o estudo, você terá garantida assistência médica e hospitalar necessárias ao diagnóstico, tratamento e acompanhamento médico durante qualquer experiência adversa ou danos físicos relacionados a essa pesquisa e que todas as providências serão tomadas pela instituição aonde será realizado o estudo. Em qualquer etapa do estudo, terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O Coordenador da pesquisa é o Prof. Dr. José Maria Soares Jr., e os Co-investigadores, Prof. Dr. Edmund Chada Baracat e a Dra. Ione Maria R. Soares Lopes. Os dois primeiros poderão ser encontrados na Rua Pedro de Toledo, 592, Setor de Ginecologia Endócrina, fone (11)5176-4147 e a Dra. Ione, poderá ser contactada na Av. Frei Serafim 260, fones (86)3221-3040 e 9988-9927.

Caso haja alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM, situado na Rua Botucatu, 572, 1º andar, fone-(11)5571-1062.

Fica assegurada sua desistência em participar do estudo em qualquer etapa do tratamento e caberá também ao médico pesquisador responsável, a qualquer momento, proceder a sua exclusão se necessário for para o seu bem estar.

Todas as informações obtidas relativas à sua participação nesse estudo serão analisadas em conjunto com as de outras pacientes, resguardando o anonimato de sua participação.

Fica assegurado o seu direito de ser atualizada sobre os resultados parciais dessa pesquisa ou dos resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Fica claro, também, que a sua participação será isenta de despesas e que terá garantia de tratamento hospitalar no Hospital Getúlio Vargas ou na UNIFESP, quando necessário.

Também não há compensação financeira relativa a sua participação. Se houver qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal diretamente provocado pelos procedimentos ou tratamentos da pesquisa (nexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como as indenizações legalmente estabelecidas.

Os pesquisadores assumem o compromisso de utilizar os dados somente para esta pesquisa.

Eu discuti com a Dra. Ione Maria Ribeiro Soares Lopes, sobre a minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros para mim os ganhos que este estudo trará, os exames que serão realizados, dores e riscos. A garantia de que as dúvidas poderão ser tiradas sempre. Ficou claro, também, que não pagarei nada para participar e que terei tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem multas,

prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu tenha adquirido, ou no meu atendimento deste serviço.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo, recebendo a aprovação n ° **0164/09** em 11 / 06 /2009. Sua realização está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Res 196/96 e 251/97) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisa biomédicas.

_____ Data ____/____/20____
Assinatura da paciente ou Responsável legal

_____ Data ____/____/20____
Assinatura da testemunha

ANEXO Iii

Ficha de coleta de dados



HOSPITAL GETÚLIO VARGAS – HGV

FICHA CLÍNICA Nº ____

CLÍNICA GINECOLÓGICA

Grupo de Estudo Nº ____

SETOR DE REPRODUÇÃO HUMANA

Data: __/__/2009

RG: _____

Prontuário: _____

Nome:(iniciais) _____

Profissão: _____

Endereço: _____

Cidade: Teresina UF: PI CEP: _____ Telefone: _____

Idade: _____ () 18-20 () 21-30 () 30-35

Escolaridade: () Nenhuma () 1º grau () 2º grau () Superior

Estado civil: () Casada () Solteira (sem união estável) () Solteira (com união estável)
() Outra _____

Cor/Raça: () Branca () Afro descendente

Queixa: _____

HPMA: _____

HDA: Cardiorespiratório: _____

Gastrointestinal: _____

Urinário: _____

Genital: _____

Medicamento em uso: _____

AF: Cardiovascular: _____ Endócrino/Metabólico: _____

Câncer: _____ Infecção: _____

Outros: _____

AP: Tipo de Parto: _____

Desenvolvimento em Relação Irmãos: _____

Moléstias Anteriores: _____

Cirurgias Realizadas: _____

AS: 1º Coito: _____ Nº parceiros: _____ Dispareunia: _____

Libido: _____ Orgasmo: _____ Sangramento ao coito: _____

Anticoncepção: _____

AG: Pubarca: _____ anos Telarca: _____ anos Menarca: _____ anos

Ciclos: _____ / _____ (irregulares() regulares()) Dismenorréia: _____

TPM: _____ DUM: _____ / _____ / _____

Calendário ☐ enstrua ☐ Preencher Sim Não

AO: G: _____ P: 0 A: 0 PN: 0 PC: 0

1º parto: _____ Último parto: _____

Amamentação: _____

Puerpério: _____

EXAME FÍSICO GERAL


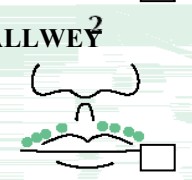
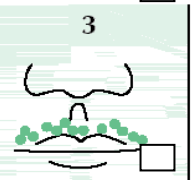
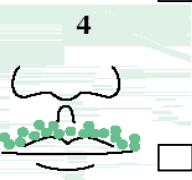




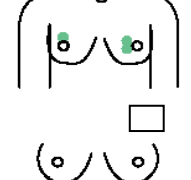
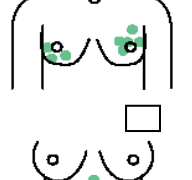
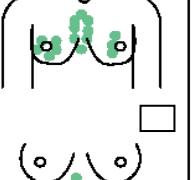

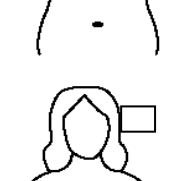
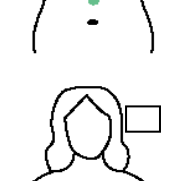
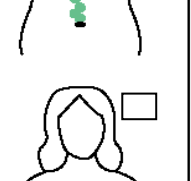
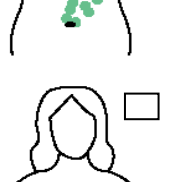
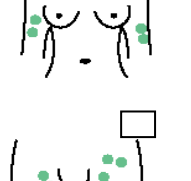
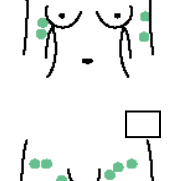
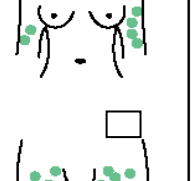
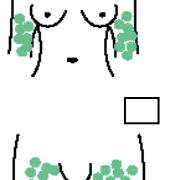
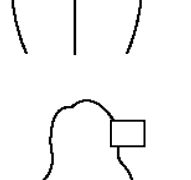
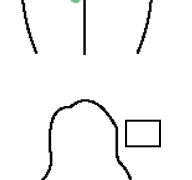
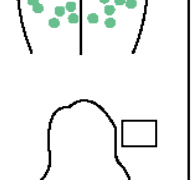
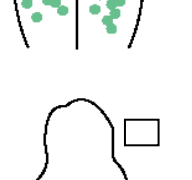
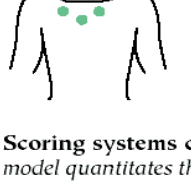



Peso: _____ Kg Altura: _____ m IMC: _____ QD: _____ cm CA: _____ cm

Ap. cardiovascular: _____ Ap. respiratório: _____

Mucosas: _____ Estado Geral: _____

Abdome: _____

Pilificação: Ginecoide () Índice FERRIMAN e GALLWEY: _____

FERRIMAN e GALLWEY		3	4
			
			
			
			
			
			
			

Scoring systems can assess the severity of hirsutism. The Ferriman-Gallwey model quantitates the extent of hair growth in nine key anatomic sites (seven of them are shown). Hair growth is graded using a scale from 0 (no terminal hair) to 4 (maximal growth), for a maximum score of 36. A score of 8 or more indicates the presence of androgen excess. (Adapted from Moncada E. J Clin Endocrinol Metab. 1970¹ and Ferriman D, Gallwey JD. J Clin Endocrinol Metab. 1961.²)

Pilificação: _____ Índice FERRIMAN e GALLWEY: Total _____

EXAME GINECOLÓGICO

Mamas: N° de 2 _____

Abdome: _____ Fígado: _____ Baço: _____

O.G.E.: _____

Distribuição pilosa: Ginecoide

Clitóris: _____

Formação labiais: _____

Formações vestibulares: _____

O.G.I.: _____

Vagina: _____

Colo: _____

Corpo: _____

Anexos: _____

Ex. Espacular: paredes vaginais: _____ Conteúdo: _____ Colo Uterino: _____

Hipótese diagnóstica (SOP)

CRITÉRIOS DE ROTHERDAM (2003) PARA DIAG. DE SOP (2 ou mais)

- 1- Oligo ou anovulação (<10 ciclos/ano – ciclos>35 dias)
- 2- Sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo
- 3- Ovários policísticos a US ≥ 10 folículos periféricos, com exclusão de causas secundárias de anovulação.

Conduta: _____

Exames solicitados: (Pacientes com suspeita clínica de SOP: todos os ex. abaixo e as Pacientes do grupo controle (férteis: exames*))

- Hemograma completo, Tipagem sanguínea*,
- Urina tipo I*
- Colpocitologia oncológica*
- BhCG
- Prolactina
- Glicemia de jejum*
- TSH e T4 livre,
- 17-OH-progesterona
- S-DHEA (sulfato)
- Dosagem de Progesterona (23º dia do ciclo, no mesmo dia programado para a biópsia de endométrio)
- TOTG
- Insulina basal
- Testosterona total e livre
- Androstenediona
- FSH, LH
- SHBG
- Cortisol basal
- USG (Transvaginal*)
- Histerossalpingografia*

Médica/Pesquisadora/Carimbo

Os métodos e valores de referência de cada hormônio para a fase folicular foram os seguintes:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI
DEPARTAMENTO MATERNO INFANTIL

Grupo de Estudo ____

HOSPITAL GETÚLIO VARGAS – HGV

CLÍNICA GINECOLÓGICA: Setor de Reprodução Humana Data ____/____/20__

Nome: _____

Grupo _____

Nº da paciente: _____

Prontuário: _____

Orientação sobre pesquisa

☒ Sim

☐ Não

Orientação cartão diário

☒ Sim

☐ Não

Assinatura TCLE

☒ Sim

☐ Não

Pré-seleção: mapa menstrual

	Mês 01	Mês 02	Mês 03	Observações
Data				
Cólicas				
Fluxo normal				
Fluxo aumentado c/ coágulo				
Fluxo aumentado s/ coágulo				
Duração (nº de dias)				
Uso de medicamentos				

CÓDIGOS PARA CÓLICAS/FLUXOS/COÁGULOS

S = sim

N = não

Nome da paciente: _____

Nº da paciente: _____

Grupo _____

ULTRASSONOGRAFIA PÉLVICA TRANSVAGINAL

Posição: _____

Útero: Corpo Longitudinal: _____ Antero-posterior: _____ Transverso: _____

Colo Longitudinal: _____

Total: _____ Volume: _____

Miométrio normal () alterado ()

.....
cavidade eco endometrial visibilizado () não visibilizado ()

espessura endometrial: _____

Observações: _____

.....
Ovário direito: Dimensões _____ x _____ x _____

Volume _____ cm³ Observações _____

.....
Cisto ausente () presente () simples () complexo ()

Medida/localização cistos: _____

Ovário esquerdo: Dimensões: _____ x _____ x _____ cm

Volume: _____ cm³

Observações: _____

.....
Cisto ausente () presente () simples () complexo ()

Medida/localização cistos: _____

Médico – Carimbo

ANEXO IV

Artigo Publicado

Rev. Assoc. Med. Bras. Vol.57 no.6 São Paulo nov./dez. 2011

ARTIGO DE REVISÃO

Endométrio na janela de implantação em mulheres com síndrome dos ovários policísticos

IONE MARIA RIBEIRO SOARES LOPES¹, MARIA CÂNDIDA PINHEIRO BARACAT², MANUEL DE JESUS SIMÕES³, RICARDO SANTOS SIMÕES⁴, EDMUNDO CHAGA BARACAT⁵, JOSÉ MARIA SOARES JR⁶

¹Docente do Departamento de Ginecologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Professora Adjunta de Disciplina de Ginecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Teresina, PI

²Alôdia Presidente de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP

³Professor Livre-docente do Departamento de Morfologia, UNIFESP, São Paulo, SP

⁴Alôdia em Obstetrícia e Ginecologia, Médico-assistente da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, FMUSP, São Paulo, SP

⁵Professor Titular da Disciplina de Ginecologia, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, FMUSP, São Paulo, SP

⁶Professor Livre-docente do Departamento de Ginecologia e Vice-chefe da Disciplina de Endocrinologia Ginecológica, UNIFESP, São Paulo, SP

RESUMO

O endométrio humano é submetido a uma complexa série de mudanças proliferativas e secretórias em cada ciclo menstrual e exibe somente pequeno período de receptividade, conhecido como "janela de implantação", necessário para a nidação do blastocisto no útero. O processo da implantação ocorre de forma sequencial, levando ao estabelecimento da gravidez. Alterações morfofuncionais durante este período podem impedir ou dificultar a implantação. Por este motivo, o estudo do endométrio nesta fase é importante para o aprimoramento de terapias que possam interferir nos mecanismos envolvidos na interação materno-embriônica. Várias doenças ginecológicas, incluindo a síndrome dos ovários policísticos (SOP), estão associadas à diminuição da fecundidade e da receptividade uterinas. Apesar de recentes avanços nas técnicas de reprodução assistida, permitindo a seleção de embriões de alta qualidade, a taxa de implantação continua baixa e não tem aumentado suficientemente nas últimas décadas. O presente artigo tem como objetivo revisar os aspectos endometriais da "janela de implantação" em mulheres com a síndrome dos ovários policísticos, focando especialmente as moléculas de adesão. Para tanto, nos valem da análise de 105 artigos publicados em revistas indexadas no PUBMED nos últimos 50 anos (até maio de 2011). Como conclusão, a receptividade endometrial parece ser o maior fator limitante no estabelecimento da gestação em grande número de doenças ginecológicas, incluindo a SOP, e o tratamento para melhorar as taxas de implantação provavelmente será nessa direção.

Unitermos: Endométrio; implantação do embrião; moléculas de adesão celular; infertilidade feminina.

SUMMARY

Endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the window of implantation

The human endometrium undergoes to a complex series of proliferative and secretory changes in each menstrual cycle and displays only a short period of receptivity, known as the "window of implantation", necessary for the implantation of the blastocyst in the uterus. The implantation process occurs in a sequential manner, leading to the establishment of pregnancy. Morphofunctional changes during this period may prevent or hinder the implantation. For this reason, the study of the endometrium at this stage is important for the improvement of therapies that may interfere with the mechanisms involved in maternal-embryonic interaction. Several gynecological disorders, including polycystic ovary syndrome (PCOS), are associated with decreased fertility and uterine receptivity. In spite of recent advances in assisted reproduction techniques, allowing the selection of high quality embryos, the implantation rate remains low and has not increased enough in recent decades. This article aims at reviewing the endometrial aspects of the "window of implantation" in women with polycystic ovary syndrome, focusing mainly on adhesion molecules. For that purpose, we analyzed 105 articles published in journals indexed in PubMed in the last 50 years (up to May 2011). In conclusion, the endometrial receptivity seems to be the major limiting factor for the establishment of pregnancy in a large number of gynecological diseases, including PCOS, and treatment to improve implantation rates is likely to be taken towards this direction.

Keywords: Endometrium; embryo implantation; cell adhesion molecules; infertility, female.

Trabalho realizado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP

Artigo recebido: 16/08/2011
Aceito para publicação: 12/09/2011

Correspondência para:
Ione Maria Ribeiro Soares Lopes
Av. Marechal Castelo Branco, 670
Ilhoteas
CEP: 64014-058
Teresina, PI, Brasil
Tel: +55 1851 9888-9927
ione.ig@uol.com.br

Conflito de interesse: Não há.
©2011 Elsevier Editora Ltda.
Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) foi inicialmente descrita por Stein e Leventhal em 1935 e caracterizada pela associação entre ovários policísticos e amenorreia, infertilidade, hirsutismo e obesidade¹. Estima-se que afeta em torno de 5 a 7% da população feminina em idade reprodutiva, representando a causa mais frequente de infertilidade anovulatória^{2,3}.

A diversidade das características clínicas da SOP levou à realização de três consensos para estabelecer critérios diagnósticos dessa síndrome. O primeiro foi a reunião do *National Institute of Health* (1990), que definiu como critérios a presença de hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e de ciclos espasmodicamente ou amenorreia (menos que seis ciclos por ano), desde que afastadas outras alterações como a síndrome de Cushing, hiperprolactinemia, deficiência enzimática da suprarrenal e distúrbios da tireoide⁴. O segundo consenso foi o de Rotterdam (2003), realizado pelas *European Society for Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) e pela *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM), que estabeleceu como critérios diagnósticos: ciclos espasmodicamente ou amenorreia (anovulação crônica), sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo e a presença de ovários policísticos (identificados pela ultrassonografia), sendo necessários pelo menos dois desses três critérios para se definir o diagnóstico da SOP⁵. O terceiro consenso foi proposto pela *Androgen Excess and PCOS Society* (AE-PCOS) em 2006, apresentando como requisitos diagnósticos o hiperandrogenismo (hirsutismo e/ou hiperandrogenemia) e a disfunção ovariana (oligo/anovulação e/ou ovários policísticos), excluindo outras causas de excesso de androgênios^{6,7}. Assim, baseado nos critérios ESHRE/ASRM (2003) e da AE-PCOS Society⁸, pode ser identificado o grande espectro de sinais e sintomas que se encontram nessas pacientes⁹.

A fisiopatologia da SOP tem intrigado ginecologistas e endocrinologistas há muitos anos e mostra muita dificuldade em ser definida. As características clínicas da síndrome refletem um desarranjo do desenvolvimento folicular resultando em anovulação crônica, em que o meio endócrino é caracterizado por um estado de equilíbrio no qual as concentrações das gonadotrofinas e dos esteroides sexuais têm pouca variação em comparação com o padrão cíclico das concentrações hormonais que ocorre durante os ciclos normais⁹. A SOP geralmente exibe aumento das concentrações séricas de LH (hormônio luteinizante) em 60% dos casos, níveis baixos de FSH (hormônio foliculoestimulante) e aumento da relação LH/FSH. A diminuição dos níveis de FSH resulta do aumento da frequência dos pulsos do GnRH (hormônio liberador das gonadotropinas) e da elevação crônica da estroina (aromatização periférica da androstenediona) e dos níveis normais ou discretamente aumentados da inibina B, derivada dos pequenos folículos ovarianos¹⁰.

A SOP tem sido considerada uma síndrome complexa, com interação de variantes genéticas e fatores ambientais que poderiam interagir, combinar e contribuir para a fisiopatologia⁴. Estudos têm sido desenvolvidos para identificar variantes genéticas envolvendo a regulação da secreção e ação das gonadotrofinas, da insulina, da regulação energética e peso, além da síntese e ação dos androgênios¹.

Uma associação entre intolerância à glicose e hiperandrogenismo foi reconhecida inicialmente por Archard e Thiers, em 1921, quando descreveram o caso de uma mulher diabética com barba¹¹. A resistência à insulina com hiperinsulinemia compensatória é atualmente reconhecida como um dos fatores-chave nessa síndrome^{12,13}. Cerca de 35% das mulheres com SOP cursam com intolerância à glicose e 7 a 10% preenchem os critérios de diabetes tipo 2. A ação da insulina em excesso seria exercida por uma ação direta nas células tecais ovarianas, via receptor de IGF-1 ou da própria insulina, ou ainda pela redução da produção hepática da proteína ligante de IGF (IGFBP), aumentando a biodisponibilidade de IGF-1 e IGF-2, além de estimular o citocromo P450c17 α , que aumenta a produção androgênica ovariana e adrenal¹⁴. A insulina e o LH atuam sinergicamente, estimulando a produção androgênica ovariana. A obesidade é uma característica comum na SOP, representando outro mecanismo para o desenvolvimento da resistência à insulina^{14,15}.

A resistência à insulina e a hiperinsulinemia são importantes na fisiopatologia da SOP, mas cerca de 25 a 50% das mulheres não têm demonstrado essas alterações, levando a considerar que elas não são causas primárias ou fator patogênico de todas as mulheres com a síndrome¹.

A disfunção ovariana (anovulação ou baixa produção de progesterona) das mulheres com SOP pode aumentar o risco para abortamento¹⁶. Enquanto a anovulação é uma causa óbvia de infertilidade na SOP, dados emergentes sugerem que a receptividade endometrial também contribui para a infertilidade¹.

A ocorrência de ovulação espontânea em mulheres espasmodicamente com SOP não leva, necessariamente, a um aumento na receptividade endometrial, principalmente em programas de fertilização¹⁷. Por outro lado, o tratamento da infertilidade com agentes indutores da ovulação, como o citrato de clomifeno, tem resultados desapontadores, com baixa taxa de gravidez¹⁸. Este fato é talvez mais bem ilustrado na fertilização *in vitro* (FIV), quando também as taxas de sucesso encontradas continuam baixas, apesar da excelente qualidade dos embriões transferidos. Isso sugere que a anovulação não é a única causa de infertilidade¹⁹, levando a crer que a receptividade endometrial poderia ter um papel crucial no estabelecimento e desenvolvimento da gravidez em mulheres com SOP.

Ione Maria Ribeiro Soares Lopes et al.

O presente artigo tem como objetivo revisar os aspectos endometriais da "janela de implantação" no endométrio normal e em mulheres com a síndrome dos ovários policísticos, destacando especialmente as moléculas de adesão.

MÉTODOS

Realizou-se uma busca no banco de dados eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmed/>, usando as palavras-chave 1-"implantation", 2-"implantation AND PCOS", 3-"implantation markers", 4-"endometrium", 5-"polycystic ovarian syndrome AND endometrium", 6-"implantation window".

A seleção inicial dos artigos foi realizada com base nos seus títulos e resumos, analisando-se os textos completos daqueles relacionados ao assunto. Um total de 105 publicações foi recuperado nesta busca, excluindo-se as repetições, sendo selecionadas para a exposição aquelas consideradas mais relevantes pelos autores dessa revisão.

RESULTADOS

MORFOLOGIA DO ENDOMETRIO NORMAL

O endométrio é a mucosa que reveste a cavidade do útero, com uma origem embriológica da linha de fusão dos ductos müllerianos, por volta da 20ª semana de gestação. A superfície é recoberta por epitélio cilíndrico simples em profundo contato, com um sistema glandular e estroma endometrial. Tem um papel essencial na reprodução e é considerado um dos mais complexos tecidos do corpo humano, respondendo a mudanças cíclicas do estrogênio e progesterona do ciclo menstrual ovariano, como também à interação complexa entre fatores autócrinos e parácrinos¹.

A descrição da fisiologia menstrual é desenvolvida com base nas mudanças anatômicas e funcionais específicas nas glândulas, nos vasos sanguíneos e no estroma do endométrio. Essa distribuição ocorre de uma forma simplificada nas fases proliferativa (inicial, média e tardia) e lútea ou secretora (inicial, média e tardia)²⁰. O processo inteiro constitui um ciclo evolutivo integrado de crescimento e regressão endometriais, que se repete durante toda a vida reprodutiva feminina^{20,21}.

A fase proliferativa é associada com o crescimento folicular e o aumento da secreção de estrogênio, levando à reconstrução endometrial. Mitoses tornam-se proeminentes e a pseudoestratificação é observada. Todos os componentes tissulares (glândulas, células estromais e endoteliais) demonstram proliferação, com síntese nuclear de DNA e citoplasmática de RNA, com pico nos dias 8-10 do ciclo, refletindo máxima concentração de receptores estrogênicos no endométrio²². Uma característica importante dessa fase é o aumento de células cilíadas e de células com microvilos, necessárias para a mobilização e distribuição das secreções endometriais. Os microvi-

los são extensões citoplasmáticas das células do epitélio endometrial, em resposta ao estradiol, e têm por função aumentar a superfície ativa das células²³.

O primeiro sinal morfológico de que ocorreu a ovulação é o aparecimento de vacúolos de glicogênio intracitoplasmáticos no epitélio glandular, por volta do 18º dia do ciclo menstrual. As células glandulares ficam tortuosas e exibem no seu interior um sistema de canais nucleares por causa da progesterona. Os vasos ficam mais espiralados, surge uma secreção ativa de glicoproteínas e peptídeos na cavidade endometrial. Transudações do plasma e imunoglobulinas da circulação são também enviadas, por proteínas ligantes produzidas pelas células epiteliais, para a região. O pico secretório é atingido sete dias após o pico de gonadotrofinas do meio do ciclo, coincidindo com o tempo de implantação do blastocisto. A proliferação cessa três dias após a ovulação, com declínio nas mitoses e síntese de DNA em razão da interferência da progesterona com a expressão do receptor estrogênico²⁴.

A fase secretora apresenta sinais da reação combinada da atividade do estrogênio e progesterona no endométrio. A progesterona estimula a 17 β -hidroxisteroide desidrogenase e sulfotransferase, que convertem o estradiol para sulfato de estrona, e esta é rapidamente excretada da célula¹. A progesterona pode inibir genes específicos que passam por variações cíclicas durante o ciclo menstrual e também antagoniza a ação estimulatória de muitos oncogenes que provavelmente mediam o crescimento induzido pelo estrogênio. O resultado final é uma estabilidade da mucosa endometrial e consequentemente a prevenção dos estados hiperplásicos^{1,25}.

A fase lútea é amplamente estudada e as modificações histológicas revestem-se de importância clínica, servindo de orientação para o diagnóstico de ovulações imperfeitas, impróprias para o processo de nidificação. A fase lútea inicial (15º dia) caracteriza-se pela presença de vacúolos secretores ricos em glicogênio abaixo do núcleo. Na fase secretora média, os vacúolos situam-se próximo à luz das glândulas, os núcleos localizam-se na posição basal e há secreção na luz glandular, além de edema do estroma. A espessura endometrial atinge 6-8 mm. Na fase lútea tardia, ocorrem modificações do estroma com as arteríolas proeminentes e dilatadas, atingindo até a camada superficial, e o endométrio é chamado de pré-decidual. A ausência de gravidez determina a involução do corpo lúteo com queda dos níveis de estrogênio e progesterona e o aparecimento da menstruação¹.

Os níveis adequados desses hormônios são importantes para o desenvolvimento endometrial harmônico, glandular e estromal, possibilitando a receptividade para a implantação do blastocisto. Na ausência do preparo endometrial adequado, haverá inúmeras possibilidades de infertilidade²⁶.

Noyes RW, Hertig AT e Rock J²⁷ examinaram as características histológicas de biópsias endometriais realizadas durante 8.000 ciclos espontâneos em 300 mulheres e instituíram os critérios de datação endometrial, que foram aceitos como padrão-ouro para a receptividade endometrial, detectando anormalidades na mesma. Embora esse trabalho clássico ainda seja muito utilizado para a análise cronológica das mudanças endometriais, têm sido identificadas deficiências. A datação é mais específica na fase lútea inicial e na tardia, mas não no período da "janela de implantação", com demonstração de poucos parâmetros histológicos e grande variabilidade interobservadores, principalmente nas mulheres inférteis nessa fase do ciclo²⁸.

Estudos recentes da expressão gênica no tecido endometrial mostraram que alguns genes presentes na fase proliferativa do ciclo menstrual são essencialmente relacionados à replicação do DNA, levando à proliferação e remodelação das células. Após a ovulação com a produção da progesterona, o endométrio sofre uma série de alterações, incluindo a inibição da proliferação celular, da síntese do DNA e da atividade mitótica, iniciando a diferenciação celular, que está relacionada com a preparação do endométrio para possível implantação embrionária. A inibição da proliferação do tecido epitelial está relacionada a genes regulados pela progesterona, incluindo a *down-regulation* dos receptores de estrogênio e a *up-regulation* de enzimas metabolizadoras do estrogênio do tipo 17β-hidroxiesteroide desidrogenase, o que efetivamente minimiza a ação estrogênica nesse tipo de célula. Além disso, a progesterona está relacionada com a regulação do receptor de andrógeno (AR) no epitélio e no estroma sete a dez dias após a ovulação, onde o endométrio torna-se receptivo à implantação embrionária no período denominado de "janela de implantação"²⁹.

"JANELA DE IMPLANTAÇÃO"

A implantação embrionária representa o passo mais crítico do processo reprodutivo em muitas espécies. Consiste em fenômeno biológico, no qual o blastocisto liga-se intimamente à superfície endometrial para formar a placenta, que fornece uma interface entre o feto e a circulação materna^{30,31}. A implantação requer endométrio receptivo e embrião no estágio de blastocisto, além de uma interação entre ambos³¹. Os dados existentes na literatura sobre o endométrio e os mecanismos iniciais da nidificação³² ainda são incipientes.

O processo da implantação ocorre de forma sequencial, em que cada passo acontece para assegurar o próximo, levando ao estabelecimento da gravidez. Pode ser classificado em três estágios: aposição, adesão e invasão. Na fase de aposição, o embrião deixa a zona pelúcida sobrepondo-se ao endométrio e as células do trofoblasto se fixam de uma forma instável à superfície do epitélio endometrial receptivo^{33,34}. Em seguida, o blastocisto se

adere de forma íntima ao epitélio endometrial, à lâmina basal endometrial e à matriz extracelular estromal. Nesse ponto, a ligação entre o endométrio e o embrião é tão íntima que resiste ao deslocamento pelo fluxo uterino, ou seja, as L-selectinas presentes nas mucinas (glicoproteína 1 - MUC1) das células do epitélio superficial do endométrio expressam epítopos receptivos que auxiliam a fixação do blastocisto³⁵. O primeiro sinal dessa reação ocorre ao redor do 21º dia do ciclo menstrual em humanos e coincide com um aumento da permeabilidade vascular, no local da fixação do blastocisto. Em seguida ocorre a penetração do blastocisto, invadindo o estroma para estabelecer uma relação com a vascularização materna e, embora essa atividade seja principalmente controlada pelo trofoblasto, a decidua também limita a extensão da invasão^{36,37}.

A implantação ocorre durante período limitado, entre o 20º e 24º dia do ciclo menstrual, denominado "janela de implantação"³⁸. Esse processo envolve uma sequência complexa de eventos que é crucial para estabelecer a gravidez. Um grande número de mediadores moleculares, sob a influência dos hormônios ovarianos, pode estar envolvido na interação feto-materna³⁹. Alterações morfofuncionais durante este período podem impedir ou dificultar a implantação. Por este motivo, o estudo do endométrio nesta fase é importante para o aprimoramento dos mecanismos envolvidos na interação materno-embrionária⁴.

Durante a "janela de implantação" as células do estroma endometrial passam por um processo de decidualização em consequência da progesterona, um processo que se caracteriza por alterações no citoesqueleto - *down-regulation* da actina do músculo liso e *up-regulation* da prolactina, dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), de proteínas de ligação IGF (IGFBPs), dos receptores de insulina, da relaxina, entre outros. O processo de decidualização é importante para regular a invasão do trofoblasto e estabelecer um ambiente adequado de citocinas e imunomoduladores no estroma, durante a implantação. Na ausência da implantação do embrião, inicia-se a remoção de estrogênio e progesterona, promovendo importantes eventos endometriais, como reações vasomotoras, apoptose celular, aumento da produção de metaloproteínas e prostaglandinas, resultando na descamação do tecido endometrial e menstruação^{40,41}.

Um grande número de moléculas tem sido caracterizado na superfície endometrial ou do embrião, mas a função precisa de cada uma permanece desconhecida. Investigadores têm explorado várias proteínas sinalizadoras como as interleucinas, receptores e ligantes, citocinas e fatores de crescimento para determinar como o embrião se implanta no endométrio. O melhor entendimento da participação molecular na implantação possibilitará o conhecimento das falhas da nidificação do blastocisto no endométrio^{38,39}.

A receptividade do endométrio consiste na aquisição de ligantes de adesão associados com menos componentes inibitórios, que poderiam formar uma barreira à implantação³⁸.

A família de moléculas de adesão celular é composta de quatro membros: as integrinas, as caderinas, as selectinas e as imunoglobulinas. A superfície ligante, usualmente glicoproteínas, medeia a adesão célula a célula e tem como funções clássicas a manutenção da integração tecidual, cicatrização de ferida, migração celular e metástase de tumores³⁹. A literatura mostra ser possível que o embrião expresse na superfície a L-selectina e o endométrio expresse ligantes apropriados e integrinas. Este mecanismo mimetiza o ataque de outras células, incluindo leucócitos, para locais do endotélio inflamado⁴⁰.

As integrinas, moléculas de adesão celular (CAMs), são consideradas boas marcadoras da receptividade endometrial e vitais para a comunicação celular. Constituem uma família de glicoproteínas, formadas pela associação de duas diferentes ligações não covalentes: subunidade α e β . As integrinas participam na matriz celular e adesão célula a célula em muitos processos fisiológicos como o desenvolvimento embriológico, hemostasia, trombose, cicatrização de feridas, mecanismos de defesas imunes e não imunes e transformação oncogênica. Uma grande variedade de integrinas tem sido mostrada na luz do epitélio endometrial glandular⁴¹. Foi descrito um aumento no endométrio das integrinas $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha V \beta 3$ na fase lútea média (20^o-24^o dia do ciclo menstrual), sendo que a expressão da subunidade $\beta 3$ não mostrou aumento antes do 19^o dia e tem sido proposta como um receptor endometrial do blastocisto⁴². Sofrem influência hormonal, onde altos níveis estrogênicos inibem a expressão das integrinas e a progesterona aumenta. As integrinas têm sido expressas pelo trofoblasto na época da implantação⁴³, mostrando a possibilidade de um modelo sanduíche na adesão embrionária⁴⁴.

As caderinas constituem um grupo de glicoproteínas transmembranas de superfície celular responsáveis pelo mecanismo de adesão célula a célula cálcio-dependente. Elas são divididas em subclasses: E, P e N-caderinas. Em relação à implantação, a subunidade E-caderina é a mais estudada; localizada na membrana celular plasmática lateral, é importante para a junção entre as células epiteliais⁴⁵. Estudos em embriões de ratas têm mostrado que mutações genéticas da E-caderina resultam em defeito na pré-implantação⁴⁶. O papel dessa proteína na implantação humana não é conhecido, contudo seus níveis têm se mostrado aumentados na fase lútea⁴⁷, embora não tenham sido evidenciadas variações no ciclo menstrual por estudos imunoistoquímicos⁴⁸. Estudos *in vitro* com cultura de células Ishikawa mostraram um aumento transitório do cálcio intracelular desencadeado pela calcitonina, suprimindo a expressão da E-caderina no local do contato

celular⁴⁹. A progesterona induz a expressão da calcitonina no epitélio endometrial na fase secretora média do ciclo menstrual⁵⁰, provavelmente regulando a expressão da E-caderina. É possível que a E-caderina tenha uma dupla função: na fase inicial, é necessária para a adesão celular e, na época da implantação, diminui para possibilitar a invasão do blastocisto⁵¹.

As selectinas são glicoproteínas que também pertencem à família CAM e incluem a P-selectina, L-selectina e E-selectina. A L-selectina é importante no processo de implantação humana e consiste em um grande domínio extracelular glicosilado e uma pequena cauda citoplasmática⁵². É conhecida por ter um papel no trânsito transendotelial de leucócitos⁵³. O sistema de adesão das selectinas está bem estabelecido na interface materno-fetal. No lado do blastocisto, a L-selectina tem sido observada e, no lado materno, a expressão dos ligantes da selectina, como MECA-79 ou HECA-452, está aumentada durante a "janela de implantação"⁵⁴. A imunoreatividade do ligante da L-selectina MECA-79 parece ser mais forte no lúmen epitelial do que no epitélio glandular⁵⁵. A importância fisiológica da interação entre a L-selectina e seus ligantes oligossacarídeos foi investigada no endométrio⁵⁶ e nas células trofoblásticas, sugerindo que este processo possa constituir o passo inicial da implantação do blastocisto⁵⁷. A função da L-selectina é regulada por uma variedade de mecanismos, incluindo transcrição genética e associações com ação no citoesqueleto, além de sua distribuição topográfica por aumento ou diminuição da superfície livre da célula. Apesar dos avanços das pesquisas, pouco se sabe sobre o envolvimento das selectinas na implantação embrionária, sugerindo que sua participação ocorra nos estágios iniciais, sinalizando o melhor local da implantação do blastocisto com a parede uterina⁵⁸.

Entre os componentes da família CAM, as imunoglobulinas são as mais extensas. A molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1 ou CD54) é uma glicoproteína transmembrana que pertence à superfamília das imunoglobulinas e expressa na superfície de vários tipos celulares, como os fibroblastos, leucócitos, células endoteliais e epiteliais. Esta molécula é regulada pelas citocinas inflamatórias e não inflamatórias. A interação da ICAM-1 é essencial para a migração transendotelial de leucócitos e para várias funções imunológicas⁵⁹. É estabelecido que o endométrio, sob condições normais, contém uma larga população de leucócitos, incluindo macrófagos, linfócitos T e granulócitos, que tem importância em muitos mecanismos fisiológicos como a decidualização⁶⁰, menstruação e parturição⁶¹. Esta população de leucócitos expressa ICAM-1 no endométrio e foi encontrada tanto nas células epiteliais quanto no estroma, sugerindo que esta proteína pode ter um papel na fisiopatologia do endométrio⁶². A relação entre a expressão da ICAM-1 e perdas gestacionais recorrentes tem sido investigada, sendo identificada em

células endometriais na fase lútea de pacientes com e sem perdas de gestações inexplicadas³⁰. Embora não se mostrou que a ICAM-1 seja indispensável nos passos iniciais da interação do blastocisto com o endométrio, ela pode participar indiretamente nesse processo por interagir com o sistema imune³⁰.

Os genes HOX são essenciais para a proliferação, diferenciação e receptividade endometriais por mediarem algumas funções dos esteroides sexuais durante cada ciclo reprodutivo. O RNA do HOXA-10 e HOXA-11 estão expressos nas células epiteliais e do estroma endometrial, principalmente nas fases secretoras média e tardia, permanecendo em altos níveis após a implantação embrionária³¹. Alguns marcadores morfológicos e moleculares específicos da "janela de implantação" são regulados pelos genes HOX, como os pinopódios, a Beta3-integrina e a IGFBP-1³².

Várias doenças benignas, incluindo a SOP, estão associadas com a diminuição da fecundidade cíclica e da receptividade uterina³³. Apesar dos avanços nas técnicas de reprodução assistida, permitindo a seleção de embriões de alta qualidade, a taxa de implantação continua baixa^{33,34}. A receptividade uterina tem um papel-chave no sucesso da gravidez e, quando alterada, pode limitar a aplicação das técnicas de reprodução assistida, contribuindo para a infertilidade em certas doenças ginecológicas, como a síndrome dos ovários policísticos³⁴.

ENDOMETRIO NA JANELA DE IMPLANTAÇÃO NA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Em mulheres com SOP, que são anovulatórias ou oligo-ovulatórias, o papel regulatório da progesterona é subótimo ou ausente, e isso resulta na constante não oposição da ação estrogênica no endométrio³⁵. Assim, o crescimento e diferenciação do endométrio em mulheres com SOP são influenciados pelos andrógenos, insulina e estrogênios, sem a oposição da progesterona. Na ausência de ovulação e sob os efeitos da regulação da progesterona, o endométrio não sofre uma transformação secretória e está constantemente exposto aos efeitos estimulantes e mitogênicos do estradiol, que podem levar ao crescimento excessivo do endométrio, padrões de sangramento imprevisível, hiperplasia e câncer.

O endométrio de mulheres com SOP é considerado modelo de endométrio disfuncional, ocorrendo superexpressão de receptores androgênicos e falha ao regular os receptores estrogênicos (REs), quando comparado ao de mulheres normais³⁶. Estudos realizados na SOP demonstram diferenças nos complementos dos receptores esteroides e coativadores, quando comparado a mulheres férteis. O endométrio, nesse caso, superexpressa os receptores androgênicos e falha a regulação do RE-alfa (receptor estrogênico-alfa) na "janela de implantação"³⁶⁻⁴¹.

A SOP apresenta outras características comuns, além do hiperandrogenismo e da disfunção ovulatória, que não estão incluídas nos critérios diagnósticos já estabelecidos, como a secreção anormal das gonadotrofinas, resistência à insulina e anormalidades metabólicas (dislipidemias). A expressão aumentada dos coativadores AIB1 (coativador 3 do receptor nuclear) do receptor do estrogênio e TIF2 (fator 2 intermediário transcricional) pode acentuar a atividade do estrogênio nas células endometriais da SOP³⁶.

Os dados existentes na literatura não esclarecem se na SOP existe uma disfunção endometrial, independente da ação da progesterona. Alguns estudos indicam que o processo endometrial, incluindo a proliferação celular, diferenciação celular e a resposta celular ao estímulo biológico, poderia ser afetado por outros fatores como citocinas e fatores de crescimento, explicando, em parte, os resultados reprodutivos pobres neste grupo de mulheres³⁶.

Existe um aumento evidente da expressão desregulada de marcadores da receptividade uterina no endométrio de mulheres portadoras da SOP. Estudos mostram que, em pacientes ovulatórias com SOP, a alfa-v-Beta3 integrina, HOXA-10, HOXA-11 e a expressão da proteína ligadora do fator de crescimento insulina semelhante (IGFBP-I) estão diminuídas durante a fase secretora^{36,42,43}. Considerações da literatura sobre a expressão e regulação da integrina $\alpha V \beta 3$ mostram que esta proteína pode representar marcador do processo de implantação humana.

A expressão do HOXA-10, *in vitro*, se mostrou diretamente diminuída pela testosterona, sugerindo que a diminuição dos androgênios poderia melhorar a receptividade endometrial⁴⁴. Estudos têm demonstrado diminuição da expressão da $\alpha V \beta 3$ -integrina e superexpressão de marcadores da atividade estrogênica (Cyr61) na "janela de implantação"³⁶.

Outro estudo mostrou também que a disfunção na implantação estaria relacionada com alterações disfuncionais endometriais nas mulheres com SOP^{36,45}.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As modificações endometriais ocorridas durante a "janela de implantação" requerem colaborações sutis de um grande número de diferentes fatores; embora alguns já tenham sido descritos, sua função individual no desenvolvimento do endométrio ainda não é completamente entendida. Os estudos em humanos, na sua maioria, têm sido desenvolvidos em ciclos fora da gravidez e os experimentos de supressão genética (em animais ou *in vitro*) fornecem evidências indiretas.

O exato mecanismo da falha da implantação ainda é pouco entendido, principalmente em doenças como a síndrome dos ovários policísticos. Embora a qualidade dos embriões seja determinante, o endométrio, por meio de um temporário e coordenado mecanismo sincronizado de receptividade de suas células com o embrião, tem uma participação inquestionável para o sucesso da gestação.

Ione Maria Ribeiro Soares Lopes et al.

A expressão diminuída dos marcadores da receptividade uterina e a falta de regulação da expressão e atividade dos receptores esteróides podem contribuir para a baixa taxa de gestação observada em mulheres com SOP. Contudo, se essas alterações acontecem pela ação inadequada da progesterona ou por causa do aumento da ação da insulina e androgênicos, não está claro até o momento.

CONCLUSÃO

A receptividade endometrial parece ser o maior fator limitante no estabelecimento da gestação em um grande número de doenças ginecológicas, incluindo a SOP; o tratamento para melhorar as taxas de implantação possivelmente será nessa direção.

As perspectivas constituem em desenvolver instrumentos, como regulação dos fatores de transcrição das proteínas endometriais ou terapia genética, para melhorar a receptividade uterina nas mulheres inférteis com SOP, e, assim, aumentar as taxas de implantação nessa população.

REFERÊNCIAS

- Spencer L, Fritz MA. Chronic anovulation and the polycystic ovary syndrome. In: Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Philadelphia; 2011 p. 495-531.
- Qiao J, Wang L, Li R, Zhang X. Microarray evaluation of endometrial receptivity in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:425-35.
- Cakmak H, Taylor HS. Human implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update*. 2011;17:242-53.
- Racacz EC, Soares Jr JM. Ovarios policísticos, resistência insulínica e síndrome metabólica. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29:117-9.
- Trivax R, Aziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol*. 2007;50:168-77.
- Azziz R, Carmina F, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W et al. PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009;91:456-88.
- Guastella F, Longo RA, Carmina F. Clinical and endocrine characteristics of the main polycystic ovary syndrome phenotypes. *Fertil Steril*. 2010;94:2187-200.
- Motta AB. Report of the international symposium: polycystic ovary syndrome: first Latin-American consensus. *Int J Clin Pract*. 2010;64:544-57.
- Giudice LC. Endometriosis in PCOS: implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20:235-44.
- Laven JS, Inaziri B, Eijkemans MJ, de Jong FH, Fauser BC. Absent biologically relevant associations between serum inhibin concentrations and characteristics of polycystic ovary syndrome normogonadotrophic anovulatory infertility. *Hum Reprod*. 2001;16:1359-64.
- Musao C, Cochran E, Moran SA, Skarulis MC, Oral EA, Taylor S et al. Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): a 30-year prospective. *Medicine*. 2004;83:209-22.
- Katiki L, Karanaki A, Misiakou G, Delkos D, Kandaraki EA, Panidis D. Phenotypic expression, body mass index and insulin resistance in relation to LH levels in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;156:181-5.
- Marcondes JA, Hayashida SA, Barcellos CR, Rocha MP, Maciel GA, Racacz EC. Metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome: prevalence, characteristics and predictors. *Arg Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51:972-9.
- Iuorno MI, Jakubowicz DJ, Baillargeon JP, Dillon R, Gann RD, Allan G et al. Effects of D-chiro-inositol in lean women with the polycystic ovary syndrome. *Endocr Pract*. 2002;8:417-33.
- Cheang KI, Baillargeon JP, Enah PA, Odund RE Jr, Apridonize T, Ilaes L et al. Insulin-stimulated release of D-chiro-inositol-containing inositolphosphoglycan mediator correlates with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2008;57:1390-7.
- Savaris RF, Grill JM, Young SL, Demayo FJ, Jeong JW, Hamilton AE et al. Progesterone resistance in PCOS endometrium: a microarray analysis in diethylstilbestrol-treated and artificial menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1737-46.
- Quezada S, Asclaira C, Johnson MC, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006;85:1017-26.
- Donaghy M, Leacy EA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med*. 2007;25:461-75.
- Giordano MC, Giordano MV, Giordano LA, Garcia SMA. Gelo menstrual. In: Giordano MC. *Endocrinologia ginecológica e reprodutiva*. Rio de Janeiro: Rubio; 2009. p.39-47.
- Murray MI, Meyer WR, Zaino RJ, Leacy EA, Novotny DR, Ireland I et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating: a systematic study of the secretory phase in normally cycling, fertile women. *Fertil Steril*. 2004;81:1333-43.
- Labrousse HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HOD. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev*. 2006;27:17-46.
- Bergeron C, Ferenczy A, Shyamala G. Distribution of estrogen receptors in various cell types of normal, hyperplastic, and neoplastic human endometrial tissues. *Lab Invest*. 1988;58:338-45.
- Rahid NA, Lalitkumar S, Lalitkumar PG, Gemell Davidson K. Endometrial receptivity and human embryo implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2011;66:23-30.
- Tabibzadeh SS. Proliferative activity of lymphoid cells in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70:437-43.
- Leacy EA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*. 2003;68:809-15.
- Achac H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journal to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006;12:731-46.
- Noyes RW, Hering AT, Rock I. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975;122:262-3.
- Myers ER, Silva S, Barnhart K, Grobman PA, Richardson MS, Robboy SI et al. Interobserver and intraobserver variability in the histological dating of the endometrium in fertile and infertile women. *Fertil Steril*. 2004;82:1278-82.
- Apfin JJ. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14:757-64.
- Gazdalogu Kayidi O, Kayidi UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med*. 2009;27:62-79.
- Simon C, Marin JC, Pollier A. Paracrine regulation of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14:815-26.
- Enders A. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat*. 1967;125:1-28.
- Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod*. 1995;10:1579-602.
- Margaris I, Taylor A, Roberts MH, Hopkins L, Davies C, Benton AG et al. MUC1 as a discriminator between endometrium from fertile and infertile patients with PCOS and endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:5320-9.
- Shackley AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003;17:289-307.

36. Psychogios A. Hormonal control of ovimplantation. *Vitam Horm*. 1973;31:205-25.
37. Bellver J, Martínez-Conejero JA, Labarta E, Alamá P, Melo MA, Remohí J et al. Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95:2335-41.
38. Zhao Y, Garcia J, Kelp L, Chacale C, Rodriguez A, Vlahos NE. The impact of luteal phase support on gene expression of extracellular matrix protein and adhesion molecules in the human endometrium during the window of implantation following controlled ovarian stimulation with a GnRH antagonist protocol. *Fertil Steril*. 2010;94:2264-71.
39. Wang J, Arntsen DR. Integrin-mediated adhesion and signalling during blastocyst implantation. *Cells Tissues Organs*. 2002;172:190-201.
40. Singh H, Aglin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat*. 2009;215:3-13.
41. Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:855-9.
42. Fujimoto I, Ichigo S, Hori M, Tanaya T. Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol*. 1996;10:187-91.
43. Ponslet C, Leblanc M, Walker-Corbeaux F, Soriano D, Feldmann G, Madoenat P et al. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002;81:195-203.
44. Li Q, Wang J, Arntsen DR, Bagchi MK, Bagchi IC. Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *J Biol Chem*. 2002;277:46447-55.
45. Kumar S, Zhu LJ, Polihronis M, Cameron ST, Baird DT, Schute F et al. Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:4443-50.
46. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med*. 2005;9:255-66.
47. Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessel leukocyte tip dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol*. 2002;14:93-104.
48. Gebauer OD, Prakobphol A, Felek RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*. 2003;299:605-8.
49. Lai TH, Shih KM, Vlahos N, Ho CL, Wallach F, Zhao Y. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2005;83:1297-302.
50. Fazleabas AT, Kim JJ. Development: What makes an embryo stick? *Science*. 2003;299:355-6.
51. Van De Stolpe A, VanDer Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*. 1996;74:13-33.
52. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*. 2006;6:28-36.
53. Yellon SM, Mackler AM, Kirby MA. The role of leukocyte traffic and activation in parturition. *J Soc Gynecol Invest*. 2003;10:323-38.
54. Delprat S, Van Langendonck A, Moulins P, Befaly P, Gonzalez D, Martinez-Madrid B et al. Human endometrial epithelial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *Am J Reprod Immunol*. 2005;54:5-12.
55. Gaffuri R, Arcidiacono L, Di Blasio AM, Vigano P, Mingoli AM, Santorola R et al. Unexplained habitual abortion is associated with a reduced endometrial release of soluble intercellular adhesion molecule-1 in the luteal phase of the cycle. *Eur J Endocrinol*. 2000;142:477-80.
56. Germeyer A, Isaksson I, Zorn M, Toth B, Capp E, Strowinski T. Metformin modulates IL-8, IL-1 β , ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells. *Reprod Biomed Online*. 2011;22:327-34.
57. Nikau G, Aghajanova L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reprod Biomed Online*. 2002;4:18-23.
58. Andersen AM, Gianaroli L, Folberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod*. 2005;20:1158-76.
59. Gregory CW, Wilson EM, Apparo KJ, Linsinger RA, Meyer WR, Kowalek A et al. Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2960-6.
60. Apparo KJ, Levey LJ, Gai Y, Linsinger RA, Levey BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol Reprod*. 2002;66:297-304.
61. Wang A, Li L, Shang W, Li M, Chen L, White RH, Han G. Expression of GPR30, ER α and ER β in endometrium during window of implantation in patients with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecol Endocrinol*. 2011;27:251-5.
62. Cernik D, Schars B, Taylor HS. Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:238-43.
63. Daltary GS, Kayali U, Seli E, Bekalmez O, Arici A, Taylor HS. Salpingectomy increases peri-implantation endometrial HOXA10 expression in women with hydrosalpinx. *Fertil Steril*. 2007;87:367-72.
64. MacLaughlan SD, Palomino WA, Mo B, Lewis TD, Linsinger RA, Levey BA. Endometrial expression of Cyp11 α : a marker of estrogenic activity in normal and abnormal endometrium. *Obstet Gynecol*. 2007;110:146-54.